

**Produção de biodiesel por catálise enzimática, em
sistemas descontínuo e contínuo,
a partir de óleo de cardo**

Maria João Galvão Morgado Bule

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias

Coorientador: Doutora Natália Melo Osório

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: - Doutora Maria Suzana Leitão Ferreira Dias Vicente, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

- Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão, Professora Adjunta da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria.

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho representa um importante marco na minha vida pessoal e formação académica e é o fecho de mais um ciclo, desta forma manifesto a minha gratidão a todos os que contribuíram directa e indirectamente e que estiveram presentes ao longo deste percurso nos momentos de ansiedade, de exaustão, de insegurança e de satisfação.

À Professora Suzana Ferreira Dias, que como minha orientadora me transmitiu os seus conhecimentos e sempre me incentivou, apoiou e que com toda a amizade contribuiu para o sucesso e desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Natália Osório pela ajuda preciosa, pelo incentivo constante, pela total disponibilidade e carinho com que sempre me orientou. O seu apoio foi determinante na elaboração desta Tese.

Agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em trabalhar com duas excelentes profissionais.

Ao Doutor Jorge Gominho, ISA, pelo fornecimento do óleo de cardo e disponibilidade demonstrada.

À Professora Carla Tecelão por toda a ajuda prestada na imobilização da enzima e apoio ao longo do trabalho.

À Eng^a Lídia Alves da Silva, pelo apoio na análise de imagem.

Ao Professor Eric Dubreucq pelo fornecimento da lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, dos suportes de imobilização e pelos conselhos na implementação do sistema em reactor contínuo de leito fixo e acompanhamento de todo o trabalho experimental.

A toda a minha família pelo apoio incondicional, acreditando sempre no meu esforço, capacidades e empenho.

Em especial aos meus pais, que sem eles não seria possível chegar tão longe na minha formação académica e que sempre me proporcionaram todas as condições para fazer mais

e melhor. Por todo o amor, ensinamentos de vida, confiança, apoio e motivação que sempre me deram.

Às minhas manas, por sempre acreditarem em mim, pela amizade e apoio em tudo o que faço.

Ao Domingos por todo o amor, incentivo, pela transmissão de confiança e de força em todos os momentos que tornam mais fáceis os dias difíceis. Obrigado por estares a meu lado.

A todos os meus amigos que sempre me apoiaram e incentivaram neste percurso.

À FCT pelo financiamento do projecto sobre “*Produção de biodiesel a partir de óleo de Cynara cardunculus (cardo), catalisada por uma lipase/aciltransferase (CYNARADIESEL)*”, no âmbito do Programa Pessoa/Hubert Curien, Acordo Portugal-França sob a responsabilidade conjunta da Professora Suzana Ferreira-Dias, ISA, e do Professor Eric Dubreucq, Montpellier SupAgro, França.

RESUMO

O objectivo principal deste trabalho foi a produção de biodiesel em sistema contínuo, por catálise enzimática, a partir de óleo de sementes de cardo (*Cynara cardunculus*, L.).

O biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos – EMAG) foi obtido por transesterificação do óleo bruto de cardo com metanol num sistema bifásico orgânico/aquoso em sistemas descontínuo e contínuo catalisada pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis* imobilizada em resinas sintéticas (Accurel MP1000 e Lewatit VP OC 1600).

Esta enzima, quando em meio bifásico, catalisa preferencialmente a transesterificação e não a hidrólise, ao contrário do que se passa com as lipases convencionais.

Em sistema descontínuo, os melhores rendimentos em EMAG (cerca de 97%) foram obtidos com a enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, ao fim de 24 h de reacção, com uma concentração de óleo de 10% (m/v) na emulsão.

O sistema de produção de EMAG foi implementado em sistema contínuo num reactor de leito fixo. Os melhores rendimentos em EMAG (cerca de 20%) foram obtidos com enzima imobilizada em Accurel MP 1000 com uma concentração de óleo correspondente a 20% (m/v) da emulsão.

Neste ensaio, a enzima demonstrou uma boa estabilidade operacional mantendo-se activa durante 15 dias, tempo ao fim do qual deixou de haver produção de EMAG.

Palavras-chave: biodiesel, transesterificação, ésteres metílicos de ácidos gordos, sistema contínuo, óleo de cardo, lipase/aciltransferase

ABSTRACT

The aim of this study is the biodiesel production from cardoon seed oil (*Cynara cardunculus*, L.) by enzymatic catalysis in batch and continuous systems.

The biodiesel (fatty acid methyl esters - FAME) was obtained by transesterification of the crude cardoon oil with methanol, in a biphasic organic/aqueous system, catalyzed by the lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* immobilized in synthetic resins (Accurel MP1000 and Lewatit VP OC 1600).

This enzyme, when biphasic media, catalyses preferentially transesterification over hydrolysis, conversely to the behaviour of conventional lipases.

In batch system, the highest FAME yield (about 97%) was obtained with the enzyme immobilized in Lewatit VP OC 1600 after 24h of reaction, with an oil concentration of 10% (m/v) in the emulsion.

The Fame production system was implemented in a packed-bed continuous reactor. The highest FAME yield (about 20%) was obtained with the enzyme immobilized in Accurel MP 1000 with an oil concentration of 20% (m/v) in the emulsion.

In this essay, the enzyme demonstrated a good operational stability, remaining active about 15 days, when the FAME production stopped.

Keywords: biodiesel, transesterification, fatty acid methyl esters, continuous system, cardoon seeds oil, lipase/acyltransferase.

EXTENDED ABSTRACT

With the growth of world population projected to be around 10 billion inhabitants in 2040, the demands, based on the petroleum energetic matrix will rise, increasing the environmental pollution and changing the climate, hindering sustainability. The sustainable growth requires a combination of non-renewable resources - petroleum - with renewable energetic sources based on biological material. In that sense, the biofuels assume an important role in research, being biodiesel the most suitable petroleum replacement in diesel engines and for power co-generation. As the populational growth is directly related with the increase of waste production, special attention must be paid to the use of non-edible and waste vegetable fats and oils, as a source of raw material for the biodiesel making.

This work, aims at testing the potential of biodiesel production (FAME) from cardoon seed oil, catalysed by the lipase/acyltransferase from *Candida parapsilosis* immobilized in Lewatit VPOC 1600 and Accurel MP 1000 (syntetic resins), in a biphasic organic/aqueous system with methanol by comparing the yields of the continuous and the batch systems.

The oil was dispersed in an aqueous buffer solution (pH 6,5) containing methanol in excess (2M in the biphasic system).

In both systems the reaction temperature was kept at 30°C, which is the optimal temperature for this enzyme.

In batch system, the experiments were carried out at the atmospheric pressure, in double wall glass cylindrical reactors (25 mL), under magnetic stirring. The amount of immobilized enzyme in Lewatit VP OC 1600 and in Accurel MP 1000 used in the essays was 10% (m/v) relative to the oil. The immobilized enzyme was recovered for use on successive essays.

In batch system, the highest FAME yield (about 97%) was obtained with the enzyme immobilized in Lewatit VP OC 1600 after 24h, with an oil concentration of 10% (m/v) in the emulsion.

In continuous system, essays were performed in a packed-bed reactor with downward feeding, using the enzyme immobilized in Lewatit VP OC 1600 for concentration of 10% and 20% (m/v) of oil in the emulsion and the enzyme immobilized in Accurel MP 1000 testing 20% (m/v) of oil in the emulsion. The reactor consisted of a double wall glass column (16,5 cm in height and 1 cm of internal diameter) with a porous glass plate G2 on the base for retention of the biocatalyst.

In continuous system, the highest yield (about 20%) was obtained with the enzyme immobilized in Accurel MP 1000 and a cardoon oil concentration corresponding of 20% (m/v) of the emulsion. In spite of a low catalytic activity, the biocatalyst remained active for about 15 days, after which the FAME production stopped.

The technique used in the reaction products analysis was the thin layer chromatography, which has revealed to be an unsuitable technique to quantify the reacting compounds, since the areas of each group of compounds depend, not only of the amount of compounds, but also on the nature of these compounds.

Keywords: biodiesel, transesterification, fatty acid methyl esters, continuous system, cardoon seeds oil, lipase/acyltransferase.

INDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	II
RESUMO	IV
ABSTRACT.....	V
EXTENDED ABSTRACT	VI
INDICE GERAL	VIII
INDICE DE FIGURAS	XI
INDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Enquadramento do tema	1
1.2. Objectivos do trabalho	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. O CARDO - <i>Cynara cardunculus</i> L.....	3
2.1.1. Caracterização e requisitos da cultura do cardo	3
2.1.2. Potencialidades do cardo para a produção de biodiesel	5
2.2. O BIODIESEL	8
2.2.1. Vantagens associadas à produção e utilização de biodiesel	9
2.2.2. Desvantagens associadas à produção e utilização de biodiesel.....	10
2.2.3. Processos de produção de biodiesel.....	11
2.2.3.1. Fontes e pré-tratamento das matérias-primas	11
2.2.3.2. Reacção de transesterificação	13
2.2.3.2.1. Reacção de transesterificação por catálise química....	15

2.2.3.2.2. Reacção de transesterificação por catálise enzimática	17
2.2.3.3. Purificação do biodiesel como produto final e do glicerol como subproduto	18
2.3. AS ENZIMAS	20
2.3.1. Caracterização e classificação das enzimas	20
2.3.2. Lipase/aciltransferase	24
2.3.3. Imobilização das enzimas	25
2.3.4. Utilização de Lipases em meios não convencionais	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1. Materiais	30
3.1.1. Óleo	30
3.1.2. Lipase/Aciltransferase	30
3.1.3. Materiais	30
3.1.4. Equipamentos	31
3.2. Métodos	31
3.2.1. Determinação da acidez do óleo	31
3.2.2. Imobilização da enzima	31
3.2.2.1. Preparação de soluções tampão	31
3.2.2.2. Imobilização da enzima em suportes sintéticos	32
3.2.2.3. Doseamento de proteína pelo método de Bradford	34
3.2.3. Produção de biodiesel em sistema descontínuo	35
3.2.3.1. Modo de operação	35

3.2.3.2 Recolha de amostras e recuperação da enzima imobilizada para reutilização	36
3.2.4. Produção de biodiesel em sistema contínuo	39
3.2.4.1. Modo de operação	39
3.2.4.2. Recolha de amostras	41
3.2.5. Análise dos produtos de reacção	43
3.2.6. Extração do biodiesel do meio reaccional.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Imobilização da enzima em Lewatit VP OC 1600 - Doseamento de proteína pelo método de Bradford.....	48
4.2. Produção de biodiesel	49
4.1.2. Produção de biodiesel em sistema descontínuo	50
4.1.3. Produção de biodiesel em sistema contínuo	54
5. CONCLUSÕES	60
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Planta de cardo	3
Figura 2 - Sementes de cardo inteiras e moídas.	4
Figura 3 - Dependência energética de Portugal (%)	9
Figura 4 - a) Equação geral para uma reacção de transesterificação; b) Equação geral da transesterificação de um triacilglicerol	14
Figura 5 - Três reacções consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' - grupos alquilo	14
Figura 6 - Energias de activação necessárias para desenvolver uma reacção exergónica: (a) na ausência de catalisador; (b) na presença de catalisador químico; (c) na presença de enzima.	21
Figura 7 - Influência da temperatura sobre a velocidade de uma reacção enzimática	22
Figura 8 - Variação de velocidade inicial de uma reacção enzimática em função do pH (exemplo da urease)	22
Figura 9 - Interação entre suporte e enzima.	28
Figura 10 - Imobilização da enzima feita em suporte Lewatit VP OC 1600.	33
Figura 11 – Reactor de vidro de parede dupla sobre agitador magnético.	35
Figura 12 - Esquema de produção de biodiesel em sistema descontínuo.....	38
Figura 13 - Reactor contínuo com enzima imobilizada e bombas de controlo de caudal.....	40
Figura 14 - Sistema contínuo de produção de biodiesel.	41
Figura 15 - Esquema do sistema em contínuo com reactor de leito fixo	42

Figura 16 - Placa de sílica-gel dividida em colunas iguais e seringa para depositar a solução contendo a amostra.....	43
Figura 17 - Placa de sílica gel pulverizada com solução alcoólica de diclorofluoresceína, visualizadas sob luz ultravioleta a 366 nm.....	44
Figura 18 - Exemplo de uma placa de cromatografia com as diferentes bandas dos constituintes da amostra.....	45
Figura 19 - Curva de calibração obtida pelo método de Bradford, 1976.....	48
Figura 20 - Produção de biodiesel em sistema descontínuo, catalisada por enzima imobilizada em Lewatit ao longo de 48 horas de reacção.	50
Figura 21 - Produção de biodiesel em sistema descontínuo, catalisada por enzima imobilizada em Accurel ao longo de 48 horas de reacção.....	52
Figura 22 - Produção de biodiesel em sistema contínuo, catalisada por enzima imobilizada em Lewatit, com 10% de óleo (m/v) ao longo de 141 horas de reacção	55
Figura 23 - Produção de biodiesel em sistema contínuo, catalisada por enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, com 20% de óleo (m/v) ao longo de 70 horas de reacção.....	56
Figura 24 - Produção de biodiesel em sistema contínuo, catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP 1000, com 20% de óleo (m/v) ao longo de 360 horas de reacção.....	57

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do óleo de cardo	5
Tabela 2 - Propriedades dos ésteres etílicos e ésteres metílicos obtidos a partir de óleo de sementes de cardo para produção de biodiesel (EN-14214).....	6
Tabela 3 - Produção em óleo (kg ha^{-1}) e biodiesel (L.ha^{-1}) do cardo comparativamente a outras oleaginosas	7
Tabela 4 - Tratamentos aplicáveis aos óleos para sua purificação.....	13
Tabela 5 - Comparação entre métodos de transesterificação por catálise alcalina e ácida para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais	17
Tabela 6 - Comparação entre a catálise alcalina e enzimática para produção de biodiesel	17
Tabela 7 - Quantidades para preparação das soluções para construção da curva padrão	34
Tabela 8 - Resultados obtidos para as quantidades de proteína imobilizadas e rendimentos das 3 imobilizações.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AG – Ácido(s) gordo(s)

AGL – Ácido(s) gordo(s) livre(s)

BXX – Biodiesel a XX %, onde XX é a percentagem de biodiesel na mistura entre biodiesel e gasóleo fóssil

DAG – Diacilgliceróis

EC – Comissão das enzimas (Enzyme Commission)

EEAG – Ésteres etílicos de ácidos gordos

EMAG – Ésteres metílicos de ácidos gordos

IUB - União Internacional de Bioquímica (International Union of Biochemistry)

MAG – Monoacilgliceróis

NP – Norma Portuguesa

TAG – Triacilgliceróis

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enquadramento do tema

A crescente preocupação com a sustentabilidade, meio ambiente e saúde pública, bem como a preocupação permanente com o esgotamento das fontes de energia não renováveis (petróleo, carvão, gás natural e nuclear), tem levado a uma consciencialização da sociedade actual e a uma busca contínua de energias alternativas que possam substituir as fontes de energia fóssil, não renovável e muito dispendiosa, diminuindo assim o impacto ambiental que os combustíveis deste tipo apresentam.

O Homem tem ao seu dispor vários tipos de energias renováveis, tais como: eólica, solar, geotérmica, maremotriz, hidráulica e da biomassa. Entende-se por energia da biomassa a fonte de energia limpa que se obtém pela transformação de produtos de origem animal e vegetal para a produção de energia calorífica e eléctrica. Na transformação de resíduos orgânicos é possível obter biocombustíveis (combustível de origem biológica, não fóssil) como o biogás, o bioálcool o biodiesel.

Segundo a legislação europeia, entende-se por biodiesel, os ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) derivados de óleos ou gorduras, de qualidade de combustível para motor diesel (Directiva 2003/30/CE).

Como fonte de ácidos gordos para a obtenção de biodiesel temos as gorduras animais (exemplo: sebo), os óleos de fritura e as sementes oleaginosas (exemplo: cardo, girassol, a colza, sésamo, palma, etc.)

Com a crise alimentar aliada à crise energética, tem-se questionado a utilização de culturas alimentares para fins energéticos. Assim, tem havido uma crescente procura de oleaginosas não alimentares que possam ser cultivadas em terrenos sem aptidão agrícola, para produção de biocombustível. Exemplos disto é o caso da *Jatropha curcas* L. (purgueira) que está a ser explorada em larga escala na Índia (Dhanda, 2003), do *Ricinus communis* L. (rícin) produzido fundamentalmente no Brasil, e da *Cynara Cardunculus*, L. (cardo), objecto de estudo da presente tese. O óleo de cardo já foi utilizado com sucesso para produção de biodiesel, por transesterificação com metanol por catálise química (Fernandez e Curt, 2004; Sengo *et al.*, 2010). Actualmente, tem-se tentado substituir os catalisadores químicos por lipases, como catalisadores da transesterificação porque as lipases como catalisadores da transesterificação porque apresentam vantagens em relação aos catalisadores inorgânicos, como: menor sensibilidade à presença de ácidos gordos livres e vestígios de água e

produtos de oxidação nas matérias-primas, menor produção de contaminantes, maior selectividade e bons rendimentos.

As lipases são enzimas largamente comercializadas que em meio aquoso catalisam a hidrólise dos lípidos, a nível da interfase água/óleo. Em meio orgânico, catalisam reacções que não são possíveis em meio aquoso (e.g. esterificações, interesterificações e transesterificações).

1.2. Objectivos do trabalho

Este trabalho enquadra-se no projecto “*Produção de Biodiesel a partir de óleo de Cynara cardunculus (cardo), catalisada por uma lipase/aciltransferase (CYNARADIESEL)*”, no âmbito do Programa Pessoa/Hubert Curien, Acordo Portugal-França. Pretende-se produzir biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos) a partir de óleo de cardo bruto por transesterificação, catalisada pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, na forma imobilizada em resinas sintéticas, num sistema bifásico orgânico/aquoso com metanol.

Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar a possibilidade de produção de biodiesel (EMAG) a partir de óleo de cardo catalisada pela lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, imobilizada nos suportes Lewatit VPOC 1600 e Accurel MP 1000 (resinas sintéticas), num sistema bifásico orgânico/aquoso com metanol, comparando os rendimentos em sistema descontínuo e contínuo, em reactor de leito fixo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O CARDO - *Cynara cardunculus* L.

2.1.1. Caracterização e requisitos da cultura do cardo

O Cardo (*Cynara cardunculus* L.) pertence à família das *Asteraceae* e ao género *Cynara* que compreende duas culturas: a alcachofra (*C. scolymus* L.) e o cardo (*C. cardunculus* L. var. *altilis* DC) e cinco ou seis outras espécies selvagens (Wiklund, 1992). Trata-se de uma planta de grande porte (2-3 metros) com folhas recortadas, flores púrpuras, agrupadas num grande capítulo, rodeado por uma fila de grandes brácteas (Figura 1). Este capítulo pode atingir um diâmetro de 4-5 cm (Benjelloun-Mlayah *et al.*, 1996). A semente é espessa, oblonga, ligeiramente achatada e angulosa, cinzenta riscada ou matizada de castanho-escuro (Figura 2). Um grama de sementes corresponde a cerca de 25 sementes (Vilmorin-Andrieux, 1885).



Figura 1 - Planta de cardo

O cardo é uma planta herbácea perene, que possui uma grande capacidade regenerativa, secando completamente no verão e rebentando com as primeiras chuvas. Possui uma raiz muito espessa e profunda que lhe permite uma boa extracção de água e nutrientes de zonas do solo muito profundas (Bassan *et al.*, 1996).



Figura 2 - Sementes de cardo inteiras e moídas.

O cardo desenvolve-se em terrenos de textura argilosa, pedregosos, bordos das estradas, em lugares incultos e ladeiras e com um pH entre 6,5 - 8 (Quilhó *et al.*, 2004). O cultivo tradicional desta espécie utiliza 2 Kg por ha de sementes para um espaçamento de 1 m x 1 m (Gominho e Pereira, 1995). É uma planta originária da região mediterrânica e Norte de África, sendo já conhecida nas antigas civilizações. Actualmente, pode ser encontrado espontaneamente em países do Mediterrâneo, na zona continental e ilhas, como é o caso do sul de Portugal e de Espanha e ilhas dos Açores e Canárias, uma vez que esta planta está bem adaptada a este clima que favorece o seu crescimento espontâneo (Bassan *et al.*, 1996; Encinar *et al.*, 1999).

Esta planta pode ser aproveitada no seu todo para diversas aplicações. As suas folhas podem ser consumidas cozidas ou utilizadas em medicina natural, em perturbações digestivas, redução do colesterol ou, mesmo, doenças de fígado. As suas flores são, tradicionalmente, usadas no fabrico de queijos artesanais (e.g. Serra da Estrela, Serpa e Azeitão), uma vez que possuem enzimas coagulantes chamadas cardosinas. Actualmente, a sua utilização está também vocacionada para a produção de energia por queima de biomassa pura, aquecimento e produção de electricidade e utilização do óleo das suas sementes para produção de biodiesel.

A vantagem da utilização do óleo das sementes de cardo, para a produção de biodiesel, é o seu menor custo de produção. A produção de cardo para uso do seu óleo será consideravelmente mais baixa do que a de oleaginosas como o girassol, porque além do óleo das suas sementes, a utilização da sua biomassa para queima com vista à produção de energia e como matéria-prima para o fabrico de pasta de papel, torna esta cultura muito mais rentável (Gominho *et al.*, 2001).

O seu grande potencial para fins energéticos resulta de uma produção de biomassa total que pode chegar a 20-30 toneladas de matéria seca por hectare/ano, só na Península Ibérica, e de cerca de 2000-3000 Kg/ano de sementes (Bassan *et al.*, 1996).

O teor de óleo nas sementes de cardo é cerca de 25%, no qual o ácido linoleico é o principal constituinte, seguido pelos ácidos oleico e palmítico (Fernández e Curt, 2004; Sengo *et al.*, 2010). Na Tabela 1, podemos verificar estas e outras propriedades do óleo de semente de cardo.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas do óleo de cardo (Fernández e Curt, 2004).

Índice de refração	1,47
Índice de iodo	125
Índice de saponificação	186,6
Índice de peróxidos (meq O ₂ /kg)	4,77
Matéria insaponificável (%)	1,87
Composição em ácidos gordos (%)	
Ácido Palmítico C16:0	10,7
Ácido Estérico C18:0	3,7
Ácido Oleico C18:1	25,0
Ácido Linoleico C18:2	59,7

2.1.2. Potencialidades do cardo para a produção de biodiesel

Desde da década de 80 do século XX que são realizados estudos que comprovam a viabilidade do cardo como cultura energética em vários países do Mediterrâneo (Fernández e Curt, 2004).

Como forte impulso para o estudo desta planta, na produção de biocombustíveis, associa-se uma alternativa potencial para a lavoura em terrenos abandonados, boa adaptação ao clima mediterrânico, bem como os custos, substancialmente mais baixos, de produção do óleo de cardo, em comparação com outros óleos convencionalmente utilizados como matéria-prima para produção de biodiesel (Fernández e Curt, 2004).

Fernández e Curt (2004) apresentaram um estudo sobre a produção de ésteres metílicos (EMAG) e etílicos (EEAG), provenientes de reacções de transesterificação, com recurso a catálise química, a partir de óleo de cardo. Através dos resultados obtidos, reforçaram os estudos até então realizados concluindo que ambos os ésteres formados são

potencialmente adequados para biocombustíveis como apresentado na Tabela 2. Sengo *et al.* (2010) otimizaram a produção de biodiesel a partir de óleo de cardo bruto, por catálise alcalina, e implementaram-na à escala piloto.

Tabela 2 - Propriedades dos ésteres etílicos e ésteres metílicos obtidos a partir de óleo de sementes de cardo para produção de biodiesel (EN-14214) ((a) Fernández e Curt, 2004; (b) Sengo *et al.*, 2010)).

Propriedades	Ésteres Etílicos	Ésteres Metílicos		EN-14214
		(a)	(b)	
Densidade a 15°C (g/cm ³)	0,8794	0,8890	0,8845	0,86-0,90
Viscosidade a 40°C (mm ² /s)	4,479	5,101	4,216	3,5-5
Ponto de inflamação (°C)	184	182	178	>101
Turvação (°C)	- 5	- 4	--	--
Ponto de obstrução do filtro a frio (°C)	- 10	- 10	--	≤ -10
Número de cetano	66	59	51,6	>51
Resíduos de carbono (% m/m) (10% resíduo de destilação)	0,28	0,36	0,01	<0,3
Índice de iodo (g I/100g óleo)	109	117	126	<120 (140*)
Fósforo (mg/kg)	<5	<5	<0,5	<10
Enxofre (% m/m)	<0,02	<0,02	0,021	<0,02

* 120 é o máximo de índice de iodo permitido na UE

A planta de cardo apresenta várias características vantajosas, como cultura energética, para o produtor (Ferreira-Dias, 2007):

- Cultura permanente com elevada resistência à secura; capacidade de sobreviver em condições de sequeiro, adaptabilidade às condições mediterrânicas (pouco exigente em água);
- Não compete para fins alimentares;
- Protege o solo da erosão;
- Potencial de exploração até 15 anos (com cortes anuais);

- Colheita em período diferente das outras culturas agrícolas (colheita a partir do 2º ano – 15/20 ton/ha)
- Baixos custos de instalação e de manutenção;
- Todas as operações podem realizar-se com maquinaria agrícola convencional;
- Possibilidade de uso de lamas de ETAR e de cinzas como adubos e fertilizantes;

No que se refere à produção de semente, os valores poderão ser da ordem dos obtidos com o girassol em condições de sequeiro conforme se pode constatar na Tabela 3. A produção potencial de biodiesel é porém mais baixa comparativamente às outras culturas devido ao seu baixo teor em óleo.

Tabela 3 - Produção em óleo (kg ha^{-1}) e biodiesel (L.ha^{-1}) do cardo comparativamente a outras oleaginosas (<http://www.isa.utl.pt/def/interreg>)

Culturas	Teor de óleo (%)	Produção de semente (kg ha^{-1})	Produção em óleo (kg ha^{-1})	Produção potencial de biodiesel (L ha^{-1})
Cardo	22	600-1000	132-220	147-245
Girassol	42	600-1200	252-504	281-561
Colza	40	1500-2000	600-800	668-891

Em termos de perspectivas futuras pode haver espaço para a cultura do cardo, sobretudo se persistir em solos marginais. Necessita porém de ser submetida a melhoramento genético visando a obtenção de maior teor em óleo e de aperfeiçoamento no que diz respeito à técnica cultural (Lourenço e Januário, 2008).

2.2. O BIODIESEL

Segundo a Directiva 2003/30/CE do Parlamento e do Conselho Europeus, Artigo 2º, o biodiesel é definido como: “éster metílico produzido a partir de óleos vegetais ou animais, com qualidade de combustível para motores diesel, para utilização como biocombustível”

São considerados biocombustíveis os seguintes produtos: biodiesel, bioetanol, biogás, biometanol, DME (biodimetiléter), bio-ETBE (Bioéter etil-*ter*-butílico), bioMTBE (Bioéter etil-*ter*-metílico), biocombustíveis sintéticos, bio-hidrogénio, óleos vegetais puros e ainda gorduras animais e óleos vegetais reciclados (Directiva 2003/30/CE). O biodiesel e o bioetanol são destes os mais comuns na utilização em veículos de transporte rodoviário a gasóleo (biodiesel) e a gasolina (bioetanol), sendo que o primeiro destacar-se-á no presente trabalho.

O biodiesel pode ser utilizado puro ou misturado com diesel, em diferentes proporções, pelo que é utilizada uma nomenclatura particular de modo a identificar mundialmente a concentração de biodiesel em mistura. Desta forma, é utilizado o acrónimo BXX de forma distintiva, onde XX é a percentagem de biodiesel na mistura, como, por exemplo, B20 que representa uma mistura de 20% de biodiesel e 80% de diesel. As percentagens mais comuns verificadas para veículos ligeiros são na gama dos 5, 15, 20 e 30% de biodiesel em diesel (Carmona e Correia, 2009).

Com a assinatura do Protocolo de Quioto, vários países acordaram em reduzir as emissões de gases de efeito de estufa, tendo a União Europeia passado a incentivar a produção de energia a partir de fontes renováveis. Sendo os biocombustíveis, líquidos ou gasosos, fontes de energias renováveis, derivados de produtos agrícolas (culturas energéticas), utilizados isoladamente ou adicionados aos combustíveis convencionais, permitem uma diminuição da emissão de gases poluentes minimizando-se, assim, o impacto no meio ambiente.

Neste contexto, Portugal comprometeu-se a determinadas metas, até então não cumpridas: redução de 5,2% das emissões de CO₂ de 1990 até 2010 e na incorporação de 5,75% de biocombustíveis nos combustíveis rodoviários até 2010. Em 2009, a Directiva 2003/30/CE foi alterada e revogada pela Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, que promove a utilização de energias renováveis. Assim, estabeleceram-se novos objectivos para os estados membros da União Europeia, que até 2020 seja alcançada uma quota de 20% de energia proveniente de fontes renováveis e de 10% de energia proveniente de fontes renováveis no sector dos transportes, principalmente biocombustíveis. Portugal estabeleceu ainda uma meta individual, atingir uma quota de 31% de energia proveniente de fontes renováveis no consumo final bruto de energia em 2020 (Directiva 2009/28/CE).

Com a constante subida dos preços dos produtos petrolíferos e consequente aumento do desenvolvimento de medidas governamentais para promover a utilização dos biocombustíveis nos transportes europeus, a procura por biodiesel tem vindo a aumentar consideravelmente.

2.2.1. Vantagens associadas à produção e utilização de biodiesel

A produção e utilização de biocombustíveis, nomeadamente o biodiesel, apresentam um conjunto alargado de vantagens em várias vertentes, tanto ambientais e sociais, como ainda nas políticas energéticas.

Como já foi referido, o biodiesel, actualmente, constitui uma óptima aposta na redução do impacto ambiental, baixa emissão de GEE (gases com efeito de estufa), assim como uma alternativa aos combustíveis fósseis devido aos seus benefícios, uma vez que se trata de uma energia renovável, biodegradável e com propriedades não tóxicas.

Uma vez que é menos poluente pode ser utilizado como combustível, já que é compatível com quase todos os motores comerciais a diesel.

Ainda no aspecto ambiental dos benefícios dos biocombustíveis, importa realçar igualmente a grande variedade de culturas bioenergéticas como fonte de matéria-prima para a sua produção.

São de salientar benefícios económicos para países, como Portugal, que sendo energeticamente dependentes de terceiros veem nos biocombustíveis uma solução ao aumento constante dos preços do petróleo. A elevada dependência energética portuguesa (78% em 2011) pode ser observada na

Figura 3, em particular de combustíveis fósseis, desde 2005 tem-se vindo a registar uma ligeira diminuição.

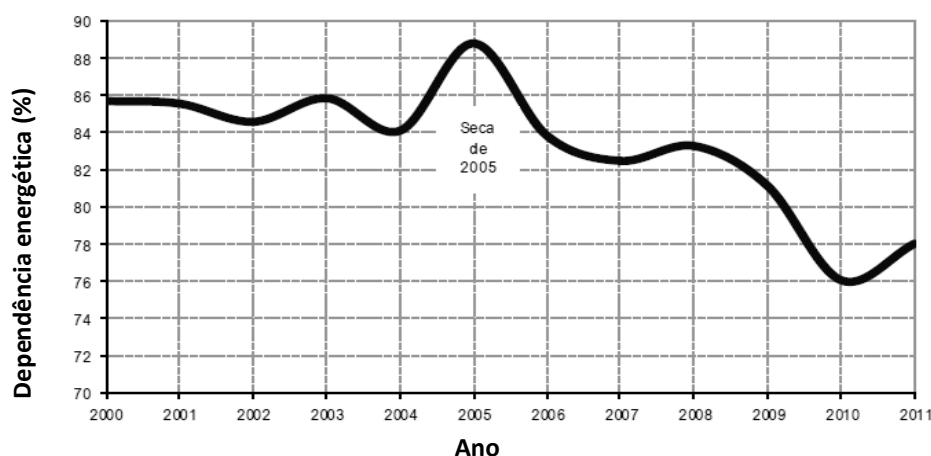


Figura 3 - Dependência energética de Portugal (%) (DGEG)

Em termos sociais, os biocombustíveis contribuem para gerar emprego no sector primário, especialmente nos países em desenvolvimento que apresentam grande potencial para a produção de biomassa, evitando o êxodo dos trabalhadores rurais, favorecendo a economia auto-sustentável fundamental para a autonomia desses países. Este mercado permite, ainda, a criação de postos de trabalho na indústria transformadora, produtora de biocombustíveis.

2.2.2. Desvantagens associadas à produção e utilização de biodiesel

Contudo, têm-se levantado algumas problemáticas associadas à produção de biocombustíveis, como por exemplo, o facto de estes não poderem, na prática, substituir os combustíveis fósseis (gasolina e gasóleo), pois a área necessária para a sua produção, implicaria uma redução da área agrícola, fundamental para a produção de matéria-prima para a produção de alimentos. Esta aumenta à medida que a população vai aumentando, pelo que nenhum país poderá fomentar o uso de biocombustíveis com o objectivo de proceder à substituição dos combustíveis fósseis, mas sim para adição aos combustíveis fósseis, para se diminuir a dependência dos países produtores e impacto ambiental.

A Agência Europeia do Ambiente (EEA) salienta que a intensidade do uso de área agrícola que está na base das culturas energéticas tem necessariamente de ser contabilizada nos balanços ambientais. Associada à utilização de biocombustíveis encontra-se então o impacto das culturas dedicadas, nomeadamente a erosão e compactação do solo, a lixiviação de nutrientes, o uso excessivo de água e a perda de biodiversidade (Pimentel, 2003).

As culturas quando permanentes provocam um impacto ambiental menor que as culturas anuais, caso das culturas bioenergéticas, uma vez que as primeiras reduzem o risco de erosão e necessitam de menor tratamento de solo, menor utilização de fertilizantes e pesticidas e as suas raízes mais profundas diminuem o risco da compactação do solo. Quanto às necessidades de água, as das culturas permanentes podem ser mais reduzidas em comparação com as culturas anuais.

Outro inconveniente é a competição directa existente entre a produção de energia e a alimentação humana. Isto é, existem culturas bioenergéticas que também desempenham um papel alimentar, como a soja, o milho e o girassol. O milho desempenha um papel muito importante na alimentação humana e animal sendo também componente de muitos outros produtos não alimentares (Manning, 2005; ONU, 2007; Plieninger, 2007).

2.2.3. Processos de produção de biodiesel

O processo mais utilizado para produzir biocombustíveis a partir dos óleos vegetais é a transesterificação dos óleos, que permite obter produtos bem definidos e com propriedades física e quimicamente muito aproximadas às do gasóleo, ficando assim com uma menor viscosidade e adaptados a qualquer motor diesel (Johnson e Myers, 1995).

O biodiesel é constituído por ésteres de ácidos gordos de cadeia longa, provenientes de óleos ou gorduras, obtidos através de uma reacção de transesterificação com metanol no qual ocorre a transformação dos triacilgliceróis em biodiesel. O glicerol é obtido como produto da reacção de transesterificação, e uma vez separado da mistura de reacção, pode ter uma série de aplicações nas indústrias farmacêutica, cosmética, indústrias alimentares e de plásticos. Contudo, actualmente estas indústrias não têm conseguido escoar o glicerol produzido nas fábricas de biodiesel. Na actualidade, aposta-se na procura de novas utilizações para o glicerol.

Na produção de biodiesel podemos definir três etapas fundamentais:

1. Produção e pré-tratamento das matérias-primas;
2. Reacção de transesterificação;
3. Purificação do produto final.

2.2.3.1. Fontes e pré-tratamento das matérias-primas

Como fonte de produção para biodiesel, podemos utilizar qualquer óleo vegetal, gordura de origem animal ou vegetal, óleos e gorduras residuais.

Os óleos vegetais, utilizados no processo de produção de biodiesel, devem ser extraídos de plantas oleaginosas por processos mecânicos e/ou métodos comparáveis, como a extracção com solvente, mas que não alterem composição e características do óleo extraído (Directiva 2003/30/CE). Ao bagaço obtido da prensagem mecânica, com 1/5 a 1/3 de óleo residual, podemos incluí-lo em ração animal desde que não contenha compostos tóxicos ou destiná-lo a propósitos energéticos (unidades de biogás) (Majer *et al.*, 2009).

Mundialmente, e dependendo da disponibilidade e das condições edafoclimáticas de cada região, os óleos vegetais mais utilizados pela indústria do biodiesel são os óleos de soja, colza, girassol e gordura de palma.

O biodiesel pode, também, ser obtido a partir de óleos e gorduras animais, onde se incluem o sebo, a banha de porco, a gordura de frango ou o óleo de peixe. Estes são fonte de ácidos

gordos com estrutura química semelhante às dos óleos vegetais, o que possibilita a sua transformação em biodiesel, mas com diferença nos ácidos gordos predominantes (Lima, 2004). Por exemplo, o óleo de colza é constituído predominantemente por ácido oleico, o óleo de soja possui o ácido linoleico (ómega-6) como ácido predominante e os óleos de peixe possuem em maior quantidade ácido linolénico (ómega-3), enquanto as gorduras de animais terrestres são ricas em ácidos gordos saturados (palmítico e esteárico).

Os óleos e gorduras residuais, utilizados na produção de biodiesel, podem ter diversas fontes, sejam eles da indústria alimentar ou comercial, onde se incluem unidades de restauração e hotelaria, cantinas ou indústrias responsáveis pela fritura de alimentos (necessitam processo de refinação, para eliminar contaminantes) ou de águas residuais associadas a indústrias alimentares e afins (indústrias de curtume, de abatimento de animais, entre outros) (Filho *et al.*, 2003).

Toda a matéria-prima para a produção de biodiesel, tem de ter as condições desejáveis à reacção, para que haja a maior taxa de conversão possível, ou seja, a matéria-prima deve estar isenta de impurezas e compostos indesejáveis. Deve apresentar, por isso, o mínimo de humidade (conseguida através de processos de secagem) e acidez possível (realiza-se neutralização com solução alcalina de hidróxido de sódio ou potássio, para remover ácidos gordos livres ou por destilação de AGL) (Lima, 2004). O óleo deve ter uma acidez baixa, ou seja, um teor de ácidos gordos livres inferior a 3% se a transesterificação for efectuada por catálise alcalina (Parmentier, 1996). Estes dois parâmetros são fundamentais para determinar a viabilidade de um óleo para o processo de transesterificação por via alcalina.

Na Tabela 4, são apresentados diversos tipos de tratamento que se podem fazer nos óleos vegetais e gorduras animais, consoante o composto que queremos eliminar/reduzir.

Tabela 4 - Tratamentos aplicáveis aos óleos para sua purificação (adaptado de Tyson, 2003; Lima, 2004).

Tratamento	Modo operacional / Funções
Remoção de gomas e resíduos sólidos	Consiste na precipitação das gomas após adição de ácido fosfórico e injeção de vapor de água. Comum para óleos e gorduras em bruto que contêm, normalmente, grandes quantidades de fosfatídeos (e.g. soja, milho)
Redução de ácidos gordos livres	Através de neutralização ou por extracção por solvente. A neutralização consiste em adicionar uma base (NaOH, KOH), induzindo a formação de sabão, que deve ser removido antes de qualquer tratamento posterior. A extracção por solvente permite remover os ácidos gordos livres ou os triacilgliceróis utilizando um solvente como, por exemplo, o etanol ou o propano líquido
Filtração	Pode realizar-se por gravidade (lento pelo que pouco utilizado na indústria) ou a vácuo (decorre a pressões negativas, de modo a acelerar o processo). Elimina pequenas proporções de sólidos existentes em suspensão e recupera líquidos contidos na fracção sólida de uma pasta.
Secagem	Utilização de um agente secante, como o sulfato de magnésio ou sódio anidros, para remover a água residual que possa existir no óleo. Secagem sob pressão reduzida.
Descoloração	Adição de carvão ou terras activadas ao óleo, conseguindo-se a remoção de metais, água e pigmentos, reduzindo a cor e a possível turvação dos óleos e gorduras.
Desodorização	Destilação sob vácuo (2 a 5 mmHg) a 240 – 270° C (dispendiosa em termos energéticos). Reduz a quantidade de cetonas e aldeídos, aclara o produto através da destruição de carotenóides, reduz a quantidade de pesticidas, detergentes, metais, etc.

2.2.3.2. Reacção de transesterificação

Como já foi referido, é através da reacção de transesterificação que ocorre a transformação dos triacilgliceróis em biodiesel. Este é constituído por ésteres de ácidos gordos de cadeia longa (C₁₄-C₂₂), provenientes de óleos ou gorduras.

A transesterificação ocorre pela reacção dos óleos ou gorduras com um álcool simples (metanol ou etanol), mediada por um catalisador que vai acelerar consideravelmente esta conversão, originando ésteres metílicos ou etílicos e, como subproduto, o glicerol (Figura 4). O processo geral é uma sequência de três reacções consecutivas, na qual são formados mono e diacilgliceróis como intermediários (Schuchardt, 1998) (Figura 5).

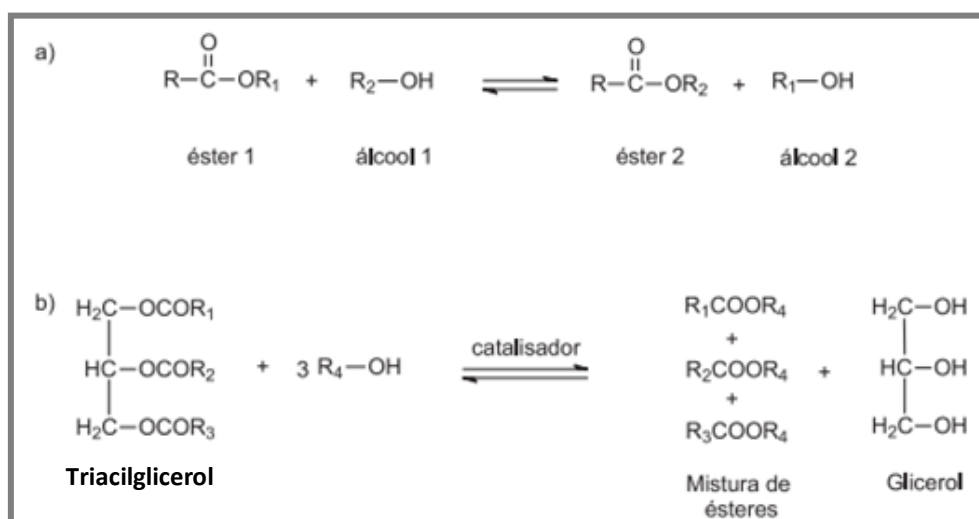


Figura 4 - a) Equação geral para uma reacção de transesterificação; b) Equação geral da transesterificação de um triacilglicerol (Geris *et al.*, 2007)

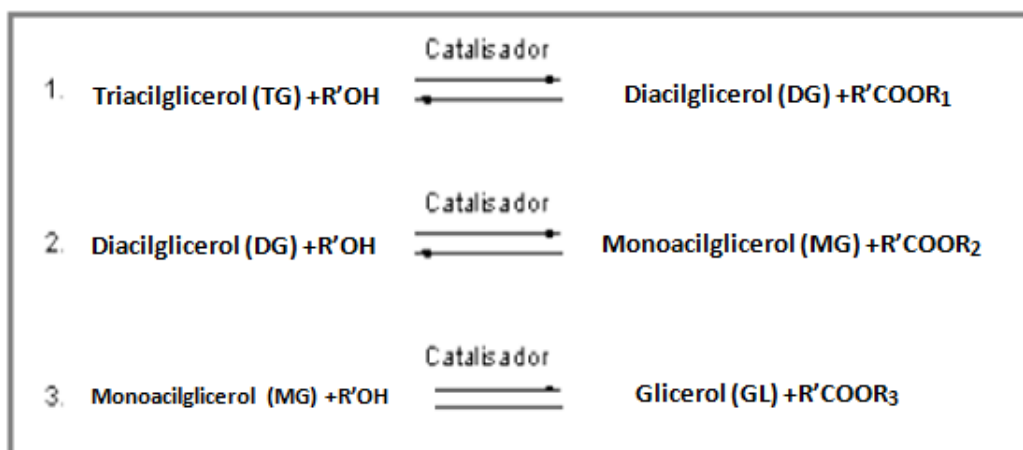


Figura 5 - Três reacções consecutivas e reversíveis. R1, R2, R3 e R' - grupos alquilo (Macedo *et al.*, 2004)

Em relação ao agente transesterificante, o processo reacctional ocorre preferencialmente com álcoois de baixa massa molecular, como por exemplo, metanol, etanol, propanol, butanol e álcool amílico (Ferrari, 2005), sendo o metanol e o etanol mais frequentemente utilizados. O metanol é o mais utilizado devido ao seu baixo custo na maioria dos países e às suas vantagens físico-químicas (maior polaridade, álcool de cadeia mais curta, reage

rapidamente com os triacilgliceróis e dissolve facilmente o catalisador básico) permite, ainda, a separação simultânea do glicerol. A mesma reacção usando etanol é mais complicada, pois requer um álcool anidro, bem como um óleo com baixo teor de água, pois a água vai inactivar o catalisador (Schuchardt *et al.*, 1998; Ma, 1999).

O processo de transesterificação pode ser realizado tanto em meio ácido como em meio básico ou utilizando enzimas. O mais comum é a utilização de catalisadores básicos, tais como KOH e NaOH onde foram observados maior rendimento e selectividade. No entanto, outros catalisadores básicos não iónicos podem ser usados na transesterificação dos triacilgliceróis, evitando a formação de subprodutos indesejáveis como os sabões. Como catalisadores ácidos, são geralmente usados, ácido sulfúrico e ácido clorídrico. Nos últimos anos, tem-se desenvolvido a conversão enzimática de óleos vegetais em biodiesel oferecendo uma opção ambientalmente mais atractiva que os processos convencionais, em que se utilizam enzimas hidrolíticas como as lipases como biocatalisadores (Schuchardt *et al.*, 1998; Ma, 1999; Modi, 2006; Tan, 2006). O catalisador é introduzido no meio reaccional com a função de aumentar a velocidade de reacção, sem alterar a composição dos elementos envolvidos no processo.

Além dos factores apresentados que influenciam a reacção, como o tipo de óleo usado ou catalisador, o processo de transesterificação é função da massa molecular do álcool, da relação estequiométrica estabelecida entre álcool e o óleo, temperatura da reacção, grau de pureza dos reagentes, principalmente o teor em água e da acidez do óleo utilizado (Schuchardt *et al.* 1998; Verdugo *et al.*, 2010).

2.2.3.2.1. Reacção de transesterificação por catálise química

A reacção de transesterificação pode ser catalisada por catalisadores alcalinos ou ácidos.

- **Transesterificação por catálise alcalina:**

O processo por catálise alcalina pode utilizar como bases o hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, carbonatos e alcóxidos como o metóxido de sódio e o butóxido de sódio. Este processo de transesterificação requer menores temperaturas e permite obter maiores velocidades e grau de conversão que com catalisadores ácidos (Macedo e Macedo, 2004).

Os catalisadores alcalinos mais aconselhados são o metilato ou metóxido de sódio, ou o etilato de sódio, por apresentarem elevada actividade, serem mais económicos e de fácil manuseamento (Erickson, 1995).

Neste tipo de transesterificação, os acilgliceróis e álcoois devem ser anidros, pois a presença de água favorece a saponificação produzindo sabões a partir da reação dos ácidos gordos livres com o catalisador (Macedo e Macedo, 2004; Al-Zuhair, 2007). Com a formação destes sabões, resulta um consumo do catalisador alcalino, reduzindo a eficiência catalítica e pode levar à formação de emulsões que criam dificuldades na recuperação e purificação do biodiesel. Assim, neste processo os óleos vegetais utilizados têm de apresentar um teor inferior a 0,5% de ácidos gordos livres e um teor máximo de água de 1% para produções industriais, o que resulta num aumento nos custos de matéria-prima que deve ser de elevada qualidade (Al-Zuhair, 2007).

Embora seja este o método mais utilizado nas indústrias, apresenta algumas desvantagens (Adamczak *et al.*, 2009):

- Problemas na recuperação do glicerol,
- Necessidade de se inactivar e remover o catalisador do produto,
- Necessidade de utilização de óleos sem ácidos gordos livres, nem água residual (os ácidos gordos livres e a quantidade excessiva de água interferem na reação negativamente),
- Fase aquosa alcalina resultante do processo requer tratamento como resíduo industrial,
- Elevado consumo energético.

• **Transesterificação por catálise ácida:**

Os ácidos utilizados como catalisadores neste método incluem o ácido sulfúrico, fosfórico, hidrocloreto e ácidos sulfónicos orgânicos.

Embora a transesterificação por catálise ácida seja mais lenta que a alcalina e requeira temperaturas elevadas (acima de 100°C), apresenta vantagens quando o óleo usado tem elevada concentração de ácidos gordos livres e água, como é o caso de óleos já utilizados para frituras e residuais. Assim, a catálise ácida não é muito utilizada na produção de biodiesel a nível industrial. Este método permite a utilização de óleos com acidez superior a 2% (Meher *et al.*, 2006, Al-Zuhair, 2007).

Como resumo, na Tabela 5, pode analisar-se e comparar-se a produção de biodiesel a partir de óleos vegetais, utilizando os dois métodos de transesterificação por catálise química.

Tabela 5 - Comparação entre métodos de transesterificação por catálise alcalina e ácida para produção de biodiesel a partir de óleos vegetais (Al-Zuhair, 2007).

Parâmetros	Catálise alcalina	Catálise ácida
Temperatura de reacção (°C)	30-65	65
Tempo de reacção (h)	1-6	69
Rendimento de ésteres metílicos (% m/m)	96	90
Remoção de	Metanol, catalisador	Metanol, catalisador
Purificação	Glicerol, sabões	Glicerol
Ácidos gordos livres	Produtos de saponificação	Ésteres metílicos, água

2.2.3.2.2. Reacção de transesterificação por catálise enzimática

Os estudos utilizando catálise enzimática têm tido cada vez maior importância, uma vez que a utilização de biocatalisadores permite condições moderadas de reacção, síntese de ésteres alquila específicos, fácil recuperação do glicerol e a transesterificação de óleos com alto teor de ácido gordos livres (Bajaj *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2011). Na Tabela 6, como resumo, podemos verificar que a catálise enzimática tem grandes vantagens relativamente à catálise alcalina.

Tabela 6 - Comparação entre a catálise alcalina e enzimática para produção de biodiesel (Macedo e Macedo, 2004).

	Catálise alcalina	Catálise enzimática
Temperatura de reacção (°C)	60-70	30-40
AGL no óleo não refinado	Produtos saponificados	Ésteres metílicos
Água na matéria-prima	Interferência na reacção	Sem influência
Rendimento de ésteres metílicos	Alto	Médio
Recuperação do glicerol	Difícil	Fácil
Purificação de ésteres metílicos	Lavagens consecutivas	Nenhum

Embora a catálise química seja realizada industrialmente em muitos países para produção de biodiesel, devido ao seu alto rendimento, a reacção apresenta algumas desvantagens como o consumo elevado de energia, dificuldade na transesterificação de gorduras com alto

teor de ácidos gordos livres, dificuldade de recuperação de glicerol, a remoção de sais inorgânicos e água do produto e o tratamento de águas residuais alcalinas são processos complexos e representam em custos adicionais (Bajaj *et al.*, 2010 Ren *et al.*, 2011).

Em contrapartida, um dos obstáculos à utilização desta técnica é o custo de produção das lipases ser mais dispendioso que dos catalisadores químicos. Para contornar e rentabilizar o custo, geralmente aposta-se na produção de lipases de alta produtividade, selectividade e estabilidade operacional e ainda na imobilização das mesmas, viabilizando a sua reutilização (Macedo e Macedo, 2004; Modi *et al.*, 2007).

2.2.3.3. Purificação do biodiesel como produto final e do glicerol como subproduto

Segundo a Norma Europeia EN14214, para que o biodiesel esteja dentro dos parâmetros aceitáveis, é necessário a etapa de purificação final, assegurando uma percentagem mínima de 96,5% de ésteres metílicos no produto final. Por isso, no final há que proceder sempre à purificação do produto final, pois, qualquer que seja o processo e as condições utilizadas na transesterificação, a reacção nunca é completa, isto é, existem no produto final triacilgliceróis que não reagiram, álcool, catalisador, sabões e/ou glicerol.

Os métodos de purificação são muito variados, podem aplicar-se métodos químicos ou físicos. Dos métodos mais utilizados, destaca-se a centrifugação. Do processo de transesterificação resultam duas fases líquidas com diferentes densidades: os ésteres metílicos ($\rho = 0,879 \text{ g/cm}^3$ a 20°C) e o glicerol ($\rho = 1,2613 \text{ g/cm}^3$ a 20°C), pelo que é possível uma separação através de centrifugação, depositando-se o glicerol na camada inferior. Devido ao inconveniente dos custos elevados deste método, pode optar-se por realizar uma decantação, onde o produto mais denso, o glicerol, é separado por gravidade do menos denso, os ésteres metílicos (Majer *et al.*, 2007). O glicerol arrasta consigo a maior parte do sabão, catalisador e álcool. Como alguns destes compostos ficam aliados aos ésteres metílicos, em seguida deve ser feita uma lavagem, por forma a removê-los. Por fim, para remover toda a água existente, o produto final deve ser seco e em alguns casos, antes de armazenar, deve ser destilado a vácuo para se obter um biodiesel mais puro (Majer *et al.*, 2007).

O glicerol resultante é neutralizado através de um ácido, obtendo-se sais, e sofre uma evaporação, para se eliminar parte da água que traz arrastada. Esta fase, é constituída por cerca de 85% (m/m) de glicerol e os restantes 15% são, maioritariamente, compostos por água (Carmona e Correia, 2009).

A este glicerol chama-se, glicerina de grau industrial e é vendida para unidades de purificação que permitem que esta seja utilizada em áreas tão distintas como a indústria de polímeros e a indústria farmacêutica (Carmona e Correia, 2009).

2.3. AS ENZIMAS

2.3.1. Caracterização e classificação das enzimas

As enzimas são biocatalisadores de natureza proteica constituídas por longas cadeias de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, segundo um arranjo tridimensional. Um catalisador é uma substância que aumenta a velocidade de uma reacção química, sem ser consumida durante a reacção (Chang, 1994).

As enzimas, além de aumentarem a velocidade das reacções bioquímicas de factores de 10^6 a 10^{12} , também são bastante específicas, actuando apenas sobre certas moléculas, os substratos (ou seja, reagentes), deixando inalterado o resto do sistema. A catálise enzimática é homogénea pois o substrato, enzima e os produtos estão todos presentes em solução aquosa (Chang, 1994).

Uma enzima é tipicamente uma proteína de dimensões elevadas que contém um ou mais centros activos. É nesses centros que ocorrem as interacções com as moléculas de substrato. Estes centros activos têm estruturas compatíveis apenas com certas moléculas com uma relação topológica semelhantes à que existe entre uma chave e a respectiva fechadura (Chang, 1994). O centro activo ou sítio activo é constituído pelo conjunto de aminoácidos que entram em contacto com o substrato. O centro activo compreende regiões responsáveis pela ligação ao substrato (local de fixação) e regiões que catalisam a reacção (centro catalítico) (Campos, 2005).

As enzimas aparecem na natureza em todos os organismos vivos. Contudo, são as fontes microbianas que possuem maior relevância a nível industrial estando estas enzimas divididas em duas categorias: as extracelulares e as intracelulares. As enzimas microbianas extracelulares são retiradas do meio de cultura e posteriormente purificadas enquanto as intracelulares distinguem-se por serem retiradas do interior ou das paredes das células (Robles-Medina *et al.*, 2009). Actualmente, são produzidas as chamadas enzimas recombinantes, que resultam da incorporação do gene pretendido (produtor da enzima) no microrganismo hospedeiro (Castro, 2003).

Como já foi referido, as enzimas são catalisadores que aceleram a velocidade de uma reacção por diminuírem a energia de activação da mesma, sem alterar a termodinâmica envolvida. Assim quanto mais baixa for a energia de activação a fornecer, mais eficaz será o catalisador (Figura 6).

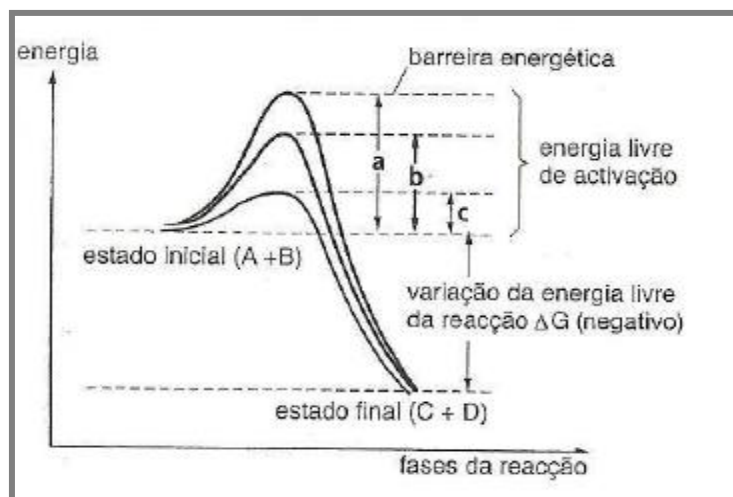


Figura 6 - Energias de activação necessárias para desenvolver uma reacção exergónica: (a) na ausência de catalisador; (b) na presença de catalisador químico; (c) na presença de enzima (Weil, 2000) citado por Campos, 2005.

A velocidade de uma reacção enzimática é medida pela quantidade de substrato consumido ou de produto formado por unidade de tempo e é dependente da temperatura e pH a que é realizada (Weil, 2000). A velocidade de todas as reacções químicas aumenta com a temperatura (Campos, 2005). Assim, quanto maior for a temperatura aplicada, maior será a velocidade de reacção, até uma temperatura óptima a partir da qual a velocidade começa a diminuir por desnaturação dos enzimas. Isto é, até ser atingida a temperatura a partir da qual a proteína enzimática, começa a ser desnaturada, vê também diminuir a sua actividade.

A temperatura óptima de uma reacção enzimática será, portanto, um compromisso entre o facto do aumento de temperatura favorecer a velocidade e a circunstância de, a partir de um certo valor de temperatura, a enzima se desnaturar (Campos, 2005) (Figura 7).

Existem vários factores que influenciam a actividade e a estabilidade das enzimas, e no caso em particular das lipases, destacando-se pela sua importância a temperatura, a actividade da água (a_w), a pressão e a presença de compostos inibidores da actividade enzimática como os produtos de oxidação lipídica e ácidos gordos livres (Wisdom *et al*, 1987; Linfield, 1988; Posorke *et al.*, 1988; Wang e Gordon, 1991, Correia e Ferreira-Dias, 1998; Xu *et al*, 1998).

Uma mudança extrema dos valores de pH pode alterar a estrutura da enzima, em especial no sítio catalítico, devido a uma repulsão de cargas. O pH extremo pode modificar irreversivelmente a estrutura da enzima, desnaturando a proteína ou modificando a ligação

entre apoenzima (parte proteica) e coenzima (parte não proteica) (Campos, 2005) (Figura 8).

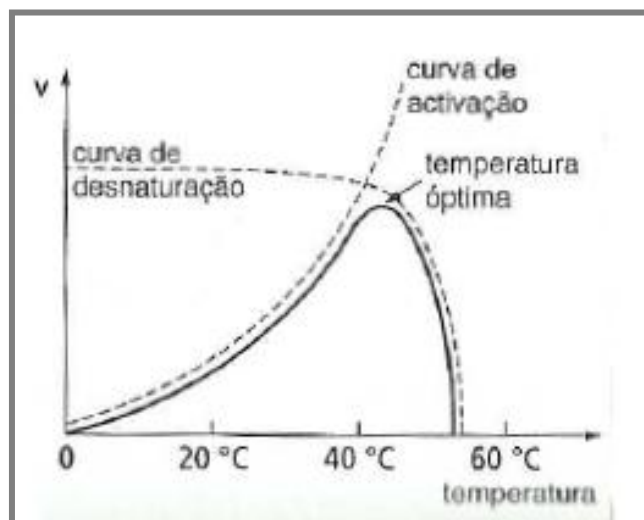


Figura 7 - Influência da temperatura sobre a velocidade de uma reação enzimática (Weil, 2000), citado por Campos, 2005.

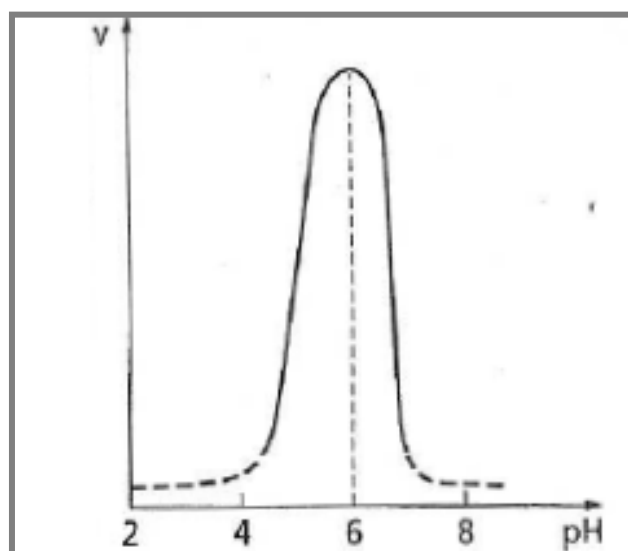


Figura 8 - Variação de velocidade inicial de uma reação enzimática em função do pH (exemplo da urease) (Weil, 2000), citado por Campos, 2005.

A actividade enzimática pode ser diminuída por compostos inibidores. Um inibidor é qualquer composto que, ao ligar-se à enzima, lhe reduz a actividade e diminui a velocidade da reacção. Estes inibidores podem ter uma intervenção reversível (quando após a dissociação com o inibidor, a enzima retorna a sua actividade) ou irreversível (quando ocorrem modificações químicas da molécula enzimática, levando uma inactivação definitiva).

Uma inibição reversível pode ser de três tipos: **Competitiva** (o inibidor e substrato têm analogia estrutural e competem pelo mesmo centro activo), **não competitiva** (o inibidor liga-se à enzima noutro local que não o centro activo e a enzima pode continuar a ligar-se ao substrato) e **mista** (provocam a diminuição simultânea da afinidade da enzima para o substrato e a velocidade máxima) (Weil, 2000; Castro, 2003; Campos, 2005).

As enzimas são classificadas de acordo com o composto sobre o qual actuam ou o tipo de reacção que catalisam, contendo sempre a terminação “ase” na sua nomenclatura. Devido ao número de enzimas conhecidas, a União Internacional de Bioquímica (IUB – International Union of Biochemistry) criou um sistema de divisão onde estabeleceu 6 classes de enzimas, de acordo com o tipo de reacção química que catalisam (Weil, 2000; Castro, 2003; Campos, 2005):

1. **Oxidoredutases:** catalisam reacções de oxi-redução, ou seja, transferência de electrões. O substrato oxidado é considerado dador de hidrogénio ou de electrões.
2. **Transferases:** catalisam a transferência de grupos químicos entre moléculas.
3. **Hidrolases:** catalisam reacções de hidrólise de ligações covalentes.
4. **Liasas:** Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente retirando ou adicionando grupos funcionais.
5. **Isomerases:** catalisam modificações geométricas ou estruturais no interior de uma molécula.
6. **Ligases (Sintetases):** catalisam a formação de novas moléculas por ligação de duas já existentes, consumindo energia sob a forma de ATP.

O sistema de classificação em vigor também serve de base para a atribuição de número de código às enzimas. Estes números, precedidos de EC (*Enzyme Classification*), contêm quatro algarismos separados por pontos (Campos, 2005):

- O primeiro algarismo indica a qual das seis categorias (classes) pertence a enzima;
- O segundo algarismo indica a subclasse;
- O terceiro algarismo, a sub-subclasse;
- O quarto algarismo é o número de série da enzima em cada sub-subclasse.

Como exemplo: a *lipase* possui a nomenclatura EC 3.1.1.3. (3. Hidrolase, 3.1. actua na ligação éster, 3.1.1. de ésteres carboxílicos, 3.1.1.3. lipase).

2.3.2. Lipase/aciltransferase

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) que actuam na hidrólise de triacilgliceróis formando ácidos gordos livres e glicerol em meio aquoso ou na reação inversa em meio orgânico. Estes biocatalisadores são comumente encontrados na natureza, podendo ser obtidos a partir de fontes animais, vegetais ou microbianas (Castro, 2004).

As lipases provenientes de microrganismos são as mais utilizadas industrialmente por apresentarem procedimentos mais simples de isolamento, serem mais estáveis e terem propriedades mais diversificadas que as obtidas de outras fontes (Carvalho, 2003). Estas enzimas não requerem cofactores, são regioespecíficas, actuam em larga faixa de pH e apresentam a capacidade única de actuar apenas na interface óleo/água (Sharma, 2001; Dalla-Vecchia, 2004). A versatilidade das lipases permite que estas enzimas sejam seleccionadas para aplicações potenciais em diversos sectores, como alimentar, de detergentes, farmacêutico, têxtil, cosmético, combustível e indústrias de papel, entre outros (Hasan, 2006).

A nível industrial, estas enzimas são produzidas por diversos microrganismos a níveis intra e extracelulares como é o caso de leveduras como *Candida rugosa* e *Candida parapsilosis*, fungos como *Rhizopus oryzae* e *Rhizomucor miehei*, e bactérias como *Bukholderia cepacia* e *Pseudomonas alcaligenes*.

As lipases variam consoante a sua regio-selectividade para a posição do éster primário, existindo dois tipos desta enzima: a lipase *sn*-1,3 selectiva, que hidrolisa as ligações éster na posição *sn*-1 e *sn*-3 do triacilglicerol, e a lipase não selectiva, que ataca indistintamente a ligação éster nas posições *sn*-1(3) ou *sn*-2. As lipases permitem a catálise de reacções de hidrólise em meio aquoso, a nível da interfase água/óleo, mas também de reacções em meio orgânico como a esterificação, transesterificação e interesterificação.

Bajaj *et al.* (2010), na sua revisão sobre a produção de biodiesel por via enzimática, referem que as características mais desejadas das lipases são a sua capacidade de utilizar todos os mono, di e triacilgliceróis bem como os ácidos gordos livres na transesterificação, a baixa inibição pelo produto, a alta actividade e rendimento em meios não aquosos, o baixo tempo de reacção, a reutilização da enzima imobilizada, a temperatura e a resistência ao álcool.

Ao longo dos estudos realizados nos últimos anos, têm-se optimizado os processos e ultrapassado as limitações da aplicação de enzimas como biocatalisadores na produção de biodiesel, a partir de diversos óleos. As lipases microbianas, extraídas de diferentes fontes,

têm sido aplicadas com sucesso como catalisador de transesterificação para produção de biodiesel.

Para além das lipases, as lipases/aciltransferases apresentam propriedades catalíticas que as tornam únicas e adequadas como catalisadores da produção de biodiesel.

A lipase/aciltransferase de *C. parapsilosis* é um biocatalisador com propriedades catalíticas peculiares pois em meio orgânico/aquoso catalisa preferencialmente a alcoólise face à hidrólise. Esta lipase demonstra especificidade para ésteres de ácidos gordos de cadeia longa e particularmente, para AG insaturados com configuração *cis*-9 (Riaublanc et al, 1993).

2.3.3. Imobilização das enzimas

A imobilização de enzimas começou a ser estudada no início do século passado, por Nelson e Griffin (1916), ao observarem que o carvão activo, ao qual havia sido adicionada uma preparação biológica com actividade invertásica, mantinha a capacidade de hidrolisar sacarose mesmo após ser lavado.

Em 1948, o bioquímico americano James Batcheller Sumner (1887-1955), ganhador do Prémio Nobel de Química, em 1946, pelo isolamento e cristalização da enzima urease e pela identificação da sua natureza proteica, reportou a sua imobilização. Na continuação destes estudos, em 1954, investigadores alemães demonstraram que polímeros sintéticos, resinas diazotadas de poliaminoestireno, poderiam ser usados para imobilizar proteínas com atividade biológica, como as enzimas pepsina, diastase, ribonuclease e carboxipeptidase (Chibata, 1978).

Até aos meados da década de 1960, a maior parte dos trabalhos com enzimas imobilizadas era realizada por investigadores de áreas básicas, que perceberam que estes sistemas poderiam ser utilizados como catalisadores industriais altamente específicos e eficientes. Neste período, passou-se também a procurar suportes com boa resistência química e mecânica, de modo a prolongar o uso do biocatalisador. Foram estudados métodos diferentes de imobilização e combinação de métodos, e observou-se que as propriedades catalíticas de uma mesma enzima poderiam ser alterada sem função do método de imobilização utilizado e do suporte empregado. E finalmente, tiveram início os estudos da aplicação de enzimas imobilizadas em biorreactores contínuos (leito fixo e reactores agitados). Isto marca o início da contribuição dos engenheiros químicos para o projecto de biorreactores (Vieth, 1994).

Por imobilização em suportes sólidos, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte. O complexo enzima – suporte mantém as características físicas do suporte e, ao mesmo tempo, deve reter a actividade biológica da enzima na forma solúvel. Os métodos de imobilização variam da simples ligação por adsorção física em suportes diversos até a encapsulação em matrizes de sol-gel e granulação.

Comparativamente com as enzimas imobilizadas em suporte sólido, as enzimas livres são mais fáceis de preparar e apresentam um custo de preparação muito mais baixo. No entanto, as enzimas na forma solúvel só têm uma única utilização. Por esta razão, é economicamente mais vantajosa a imobilização das enzimas tornando-as uma fase independente no sistema reaccional e possibilitando a sua recolha e reutilização (Al-Zuhair, 2007). Assim, as vantagens das enzimas imobilizados, em relação às solúveis, surgem da sua maior estabilidade e facilidade de separação do meio de reacção, o que acarreta economia significativa no custo global do processo, desde que o procedimento de imobilização não seja muito dispendioso, haja boa recuperação da actividade enzimática e que a estabilidade operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa.

Castro (2003) apresenta, resumidamente, as seguintes vantagens e desvantagens da utilização de imobilização:

❖ **Vantagens:**

- Retenção do biocatalisador no reactor;
- Elevada concentração de catalisador no reactor, permitindo intensificar o processo;
- Controlo do microambiente da enzima;
- Facilidade de recuperação e reutilização do catalisador, o que reduz os custos das enzimas;
- Possibilidade de ser utilizado em sistemas contínuos.

❖ **Desvantagens:**

- Perdas de capacidade catalítica durante a imobilização;
- Problema de transferência de massa interna no caso de suportes porosos;
- Separação física entre o catalisador e o fluido, podendo ocorrer degradação mecânica e libertação de partículas finas;
- Tempos de reacção mais longos.

Em suma, o uso de reactores com lipases imobilizadas diminui o potencial de contaminação do produto, pela presença de lipases residuais no produto; a técnica de imobilização melhora a estabilidade térmica e química das enzimas e abre oportunidades para um melhor controlo do processo e da qualidade do produto (Messing, 1975; Khmelnitsky *et al.*, 1988)

Para as reacções de interesterificação, têm sido muito usados a nível laboratorial e industrial, os reactores descontínuos com agitação e as lipases imobilizadas, porque são muito versáteis e fáceis de operar (Marlot e Landgrand, 1985; Macrae, 1985). A utilização de agitação magnética evita os gradientes de temperatura e de concentração dentro do reactor. Contudo, pode levar à destruição das partículas do biocatalisador, em situações de agitação muito intensa. Depois da reacção estar concluída, a separação da lipase imobilizada da mistura reaccional é feita através de uma simples filtração (Malcata *et al.*, 1990)

Existem vários métodos de imobilização de enzimas que podem ser divididos em três grupos principais:

1. Ligação a um suporte insolúvel em água;
2. Ligações intermoleculares de enzimas, por uso de reagentes bi- ou multifuncionais;
3. Aprisionamento, isto é, incorporação das enzimas em matrizes de géis ou microcápsulas (Castro, 2003).

Para os vários métodos disponíveis no que respeita à estabilização de enzimas imobilizadas, duas vertentes têm de ser consideradas: a estabilidade no armazenamento e a estabilidade operacional. A estabilidade no armazenamento refere-se à capacidade de uma enzima manter a sua capacidade catalítica durante o período entre a produção e o seu uso. A estabilidade operacional descreve a manutenção da actividade catalítica da enzima durante a reacção. A estabilidade operacional pode ser ainda avaliada na ausência ou presença do substrato (Lemos *et al.*, 2001; Sá-Pereira *et al.*, 2003, 2004; Chaniotakis, 2004).

Existem vários factores a ter em consideração, desde os materiais a utilizar como suportes de imobilização até às condições utilizadas durante o processo, que tornam difícil definir quais as técnicas e suportes a utilizar. Como não existe um método geral de imobilização ou um suporte universal, há que procurar a melhor técnica e suporte que não comprometam a actividade catalítica da enzima imobilizada.

As propriedades das preparações de enzimas imobilizadas são influenciadas pelas propriedades da enzima e do material do suporte (Tischer e Kasche, 1999).

A interação entre esses dois componentes proporciona um derivado imobilizado com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas (Figura 9).

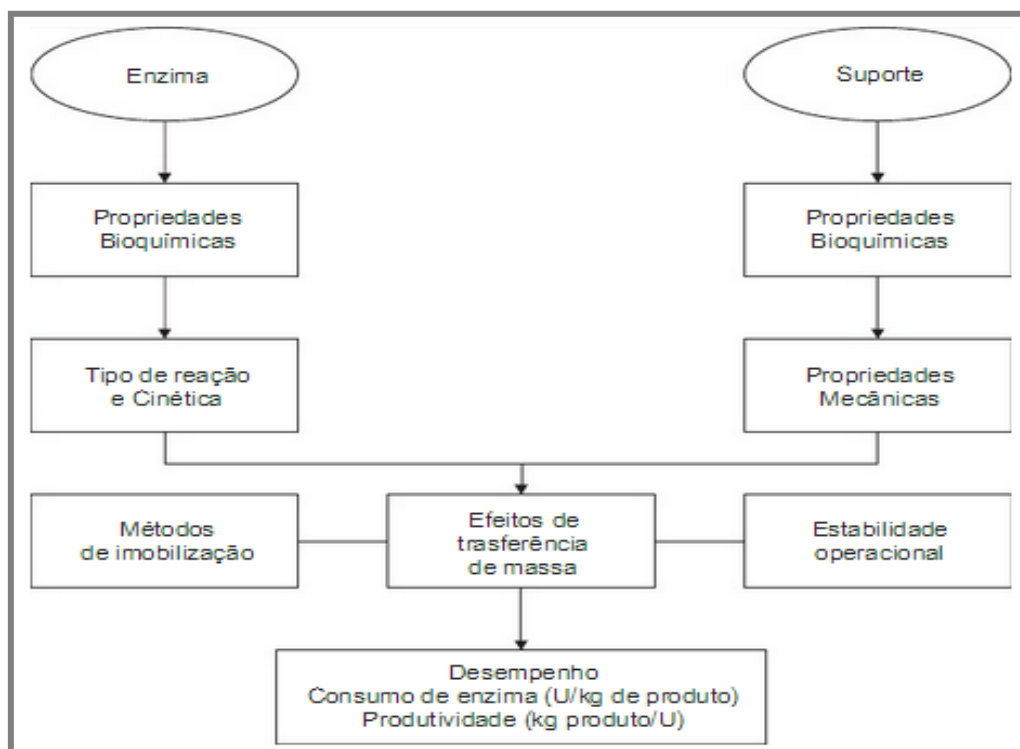


Figura 9 - Interação entre suporte e enzima (Sá-Pereira, 2008).

2.3.4. Utilização de Lipases em meios não convencionais

Tradicionalmente, a catálise enzimática limitava-se ao estudo de reações em meio aquoso, o que restringia em muito as possibilidades de aplicações industriais. A partir da observação de que muitas enzimas, tais como lipases, desidrogenases, esterases e outras, actuam *in vivo* em ambientes ricos em lípidos, constatou-se que os ambientes pobres em água ou microaquosos também poderiam ser meios adequados à catálise enzimática (Baron, 2003). Assim, foram iniciados estudos no sentido de explorar a catálise enzimática nos chamados meios reacionais não-convencionais, nos quais se incluem os solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fluidos iônicos, fases gasosas e sólidas (Adlercreutz, 1996; Cernia e Palocci, 1997; Langone 1998; Oliveira, 1999).

A biocatálise em meio orgânico amplia as possibilidades de aplicação das enzimas. Algumas das principais vantagens em utilizar lipases em meio orgânico em vez de as utilizar em meio aquoso, incluem (Gupta, 1992; Illanes, 1994):

- Mudança do equilíbrio termodinâmico a favor da síntese;
- Redução das reacções secundárias, dependentes da presença de água;
- Eliminação da contaminação microbiana;
- Conversão de substratos insolúveis em meio aquoso;
- Variação na especificidade e selectividade enzimática;
- Facilidade de recuperação de produtos e do biocatalisador;
- Aumento da termoestabilidade do biocatalisador;

Em condições em que a quantidade de água é reduzida, a hidrólise da gordura é minimizada para que a interesterificação catalisada por lipases seja a reacção dominante (Macrae, 1985; Jaeger *et al.*, 1994).

A água é necessária para a actividade enzimática pois participa em todas as interacções não covalentes que mantêm a conformação da enzima nativa e a sua actividade catalítica. Como tal, a desidratação total de uma preparação enzimática potencia a sua desnaturação, inactivando-a. É então essencial que exista sempre uma pequena quantidade de água, mesmo que em quantidades vestigiais correspondente a uma monocamada de água em torno da enzima (Zaks e Klibanov, 1985).

Apesar da biocatálise em meio orgânico oferecer numerosas vantagens, o uso destes sistemas apresenta alguns problemas que devem ser avaliados antes de se decidir pela sua utilização (Illanes, 1994):

- Possibilidade de desnaturação e/ou inibição do biocatalisador pelo solvente;
- Aumento da complexidade do sistema reacional;
- Custos adicionais com solventes, co-solventes e emulsionantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Óleo

A matéria-prima utilizada foi óleo de cardo, obtido por extração mecânica de sementes de plantas de cardo cultivadas no Campo Pedagógico de Plantas Bioenergéticas, BioenergISA, do Instituto Superior de Agronomia.

Após a extração, o óleo foi centrifugado e filtrado, conseguindo-se eliminar partículas sólidas em suspensão. O óleo utilizado no ensaio contém 1,3% de ácidos gordos livres na sua composição.

3.1.2. Lipase/Aciltransferase

Foi utilizada a lipase/aciltransferase de *Candida parapsilosis*, liofilizada, patenteada pela BASF e produzida pelo grupo do Prof. Eric Dubreucq, de Montpellier SupAgro, Montpellier, França.

3.1.3. Materiais

- ✓ Ácido acético p.a., da Panreac Química S.A.;
- ✓ Di-hidrogenofosfato de potássio;
- ✓ Di-hidrogeno fosfato de sódio;
- ✓ Etanol 96 %;
- ✓ Éter de petróleo 40-60°C, da Panreac Química S.A.;
- ✓ Éter etílico, da J. T. Baker;
- ✓ Fenolftaleína;
- ✓ Solução de Glutaraldeído, da Merck;
- ✓ Hidróxido de sódio p.a.;
- ✓ Metanol anidro p.a., da Sigma – Aldrich;
- ✓ *n*-hexano 95%, da J. T. Baker;
- ✓ Suportes de imobilização: Accurel MP 1000, Membrana, GmbH (Obernburg, Alemanha) e Lewatit VP OC 1600, Bayer (Leverkusen, Alemanha);
- ✓ Trifosfato de sódio;
- ✓ Placas de Sílica-gel 60 com 0,25 mm espessura e de 20x20 cm de área, da marca Macherey-Nagel.

3.1.4. Equipamentos

- ✓ Aparelho para medição de áreas da Leica Microsystems;
- ✓ Balança de Precisão da Kern;
- ✓ Bombas peristálticas Ismatec;
- ✓ Cabeça de aquecimento de banho termoestatizado;
- ✓ Centrífuga Sigma 3K30, com o rotor 12154 para tubos “Eppendorf”, da B. Braun Biotech Internacional;
- ✓ Placas de agitação magnética, Variomag/Compact;
- ✓ Reactores de vidro de parede dupla com capacidade de cerca de 25 mL e 30 mL;
- ✓ Tina cromatográfica, de vidro 22x20x10 cm

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da acidez do óleo

A determinação da acidez foi realizada segundo a norma Portuguesa NP-903 (1972) para Gorduras e Óleos Comestíveis. Este processo consiste na neutralização dos ácidos gordos livres de uma toma de óleo dissolvido numa mistura éter etílico/álcool etílico (1:1, v/v), por intermédio duma solução alcalina titulada de NaOH a 0,1N. A titulação é realizada até a solução adquirir o tom rosado devido à prévia adição do indicador fenolftaleína.

A acidez do óleo (A), é expressa em percentagem de ácido oleico, é determinada através da seguinte expressão:

$$A = \frac{2,82 \ v}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde v é o volume da solução alcalina 0,1N gasto na titulação (cm^3) e m representa a massa da toma de óleo (g) (Anexo I).

3.2.2. Imobilização da enzima

3.2.2.1. Preparação de soluções tampão

➤ *Solução tampão de fosfato pH 7,0; 0,1M*

Esta solução tampão foi preparada a partir das soluções-mãe, A e B, seguintes:

- Solução aquosa de NaH_2PO_4 , MM = 137,98 g/mol (A)
- Solução aquosa de Na_2HPO_4 , MM = 141,96 g/mol (B)

Para a preparação de 500 mL de solução tampão procedeu-se da seguinte maneira: pesaram-se as quantidades 6,95 g e 7,11 g de A e B, respectivamente, em dois balões volumétricos de capacidade 250mL, foi feita a dissolução dos reagentes com água destilada até se obter os volumes definidos. Depois, misturou-se o volume dos dois balões para um balão volumétrico com 500 mL de capacidade. Por fim, mediu-se e acertou-se o pH, quando necessário, para um valor de 7,0.

➤ **Solução tampão de fosfato pH 6,5**

Esta solução tampão foi preparada a partir das soluções seguintes:

- Solução aquosa de KH_2PO_4 , 0,1M, MM = 136,09 g/mol (C)
- Solução aquosa de NaOH, 0,1M, MM = 39,9971 g/mol (D)

Para preparação de 200 mL desta solução tampão, pesaram-se as quantidades 1,36 g de (C) e 0,2 g (D), para balões volumétricos de 100 mL e 50 mL, respectivamente, e em ambos os casos, completou-se o volume com água destilada.

Depois de devidamente dissolvidas, as soluções foram passadas para um único balão de 200 mL, perfazendo-se o volume com água destilada. Feito isto, mediu-se o pH, e acertou-se, quando necessário, para o valor 6,5.

➤ **Solução tampão de fosfato pH 6,5; com 4M de metanol**

À solução anterior juntou-se uma porção de metanol de modo a obter uma concentração 4M, para conservação da enzima imobilizada.

3.2.2.2. Imobilização da enzima em suportes sintéticos

As resinas Accurel MP 1000 e a Lewatit VP OC 1600 são suportes hidrofóbicos.

A imobilização é estabelecida por adsorção física entre as superfícies hidrofóbicas em torno do centro activo da enzima e os grupos hidrofóbicos da matriz, com a consequente estabilização da forma aberta da lipase.

O glutaraldeído é adicionado após a imobilização para promover as ligações estáveis entre a lipase e a matriz, bem como para promover as ligações intermoleculares entre as moléculas de enzima e impedir a sua lixiviação para o meio reaccional.

Para a imobilização da enzima em Lewatit VP OC 1600, utilizou-se uma proporção de 1:4 (1 g suporte para 0,25 g enzima) conforme otimizado anteriormente por Tecelão *et al.* (2012). Inicialmente dissolveu-se a enzima (0,25 g) em 50 mL de solução tampão de fosfato

pH 7,0; 0,1M. Adicionou-se 1 g de suporte e colocou-se em agitação na placa magnética durante 18 horas (Figura 10).

Depois de 18 horas filtrou-se a vácuo, o imobilizado foi novamente colocado no balão de Erlenmeyer adicionando-se 25 mL de solução de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato pH 7,0; 0,1M (6 mL de solução de glutaraldeído + 54 mL tampão = 60 mL).

Colocou-se mais uma vez sob agitação magnética durante 2 horas, ao fim das quais se filtrou novamente.

O imobilizado fica depositado no filtro, sendo lavado com 50 mL de solução tampão fosfato por duas vezes.

Para terminar, deixou-se secar ao ar durante cerca de 5 minutos.

De modo a adsorver o máximo de enzima em solução, para Lewatit VP OC 1600 testou-se um processo de três imobilizações sucessivas sempre com resina nova a qual foi posta em contacto com a solução inicial de enzima (1ª imobilização), com o filtrado resultante da 1ª imobilização (2ª imobilização), e com o filtrado da 2ª imobilização (3ª imobilização). Em cada imobilização utilizou-se uma massa de 1,476 g de resina.

No procedimento para a imobilização da enzima em Accurel MP 1000 começou por se humedecer o suporte com etanol (1 g / 0,7 mL etanol), durante aproximadamente 15 min, de modo a excluir o ar contido nas partículas. Depois, o etanol foi cuidadosamente retirado utilizando uma micropipeta.

O restante procedimento foi similar ao que se descreveu para a imobilização em Lewatit VP OC 1600.

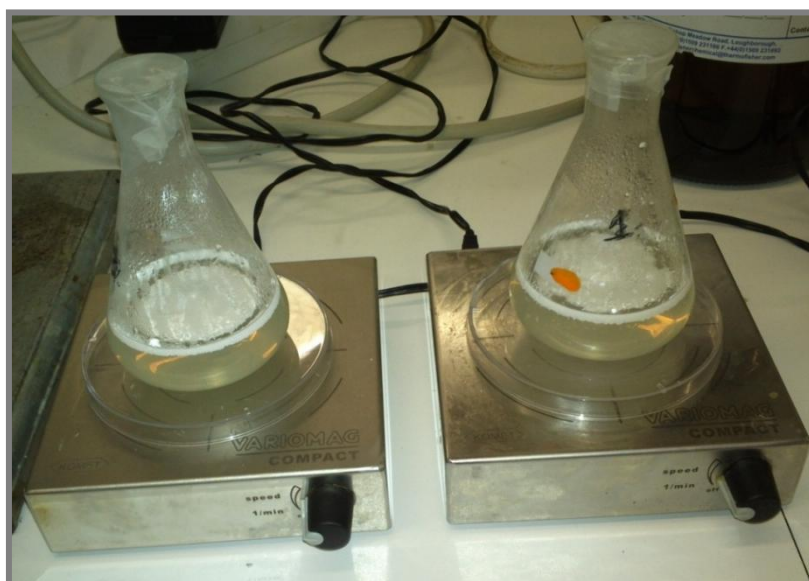


Figura 10 - Imobilização da enzima feita em suporte Lewatit VP OC 1600.

3.2.2.3. Doseamento de proteína pelo método de Bradford

Utilizou-se o método de Bradford para determinar a quantidade total de proteína imobilizada na resina Lewatit VP OC 1600 e calcular o rendimento de imobilização (adaptado de Bradford, 1976).

Primeiro prepararam-se as seguintes soluções:

- *Solução tampão de fosfato 100 mM, pH=7,0*

Pesou-se 6,80 g de KH_2PO_4 (a) para 500 mL de água destilada e 2,00 g de NaOH (b) também para 500 mL de água destilada. Foram-se adicionando à solução (b) pequenos volumes da solução (a) até se ajustar o pH=7,0. Armazenou-se a 2°C.

- *Solução de Coomassie*

Dissolveu-se 0,1 g de *Coomassie Brilliant Blue G 250* ($\text{MM} = 854,04 \text{ g/mol}$) em 50 mL de etanol 96% (v/v). A esta solução foram adicionados 100 mL de ácido (orto) fosfórico. A solução foi passada para um balão volumétrico de 1 L e fez-se o volume com água destilada. Por fim, filtrou-se a solução e armazenou-se num frasco escuro.

- *Solução com 1 mg/mL de albumina de soro bovino*

Dissolveu-se 0,01 g de albumina de soro bovino (BSA- *bovine serum albumin*) em 10 mL de solução tampão de fosfato 100 mM, pH 7,0, preparada anteriormente (sem agitar).

O procedimento dividiu-se em duas etapas distintas. Na primeira prepararam-se, em tubos de ensaios, as soluções para a construção da curva padrão, conforme a Tabela 7. Esta curva permitiu calcular a concentração total de proteína nas amostras analisadas.

Tabela 7 – Quantidades para preparação das soluções para construção da curva padrão

Tubo	[Proteína] (mg/mL)	BSA (μL)	Tampão (μL)	Volume total (μL)
1	0	0	100	100
2	0,2	20	80	100
3	0,4	40	60	100
4	0,6	60	40	100
5	0,8	80	20	100
6	1,0	100	0	100

Na segunda etapa, para calcular a quantidade de proteína imobilizada na resina, determinou-se a concentração total de proteína, presente em cada amostra retirada das soluções de imobilização nas várias fases de imobilização da enzima: solução inicial de

enzima, filtrado obtido após contacto da enzima com a resina, soluções tampão de lavagem e solução tampão com glutaraldeído, após contacto com a resina (c.f. 3.2.2.2.). Adicionaram-se 100 μ L de amostra, 100 μ L solução tampão e 6 mL de solução Coomassie em cuvetes de plástico, deixou-se reagir durante aproximadamente 15 minutos e procedeu-se à leitura das absorvâncias a 595 nm num espectrofotómetro.

3.2.3. Produção de biodiesel em sistema descontínuo

3.2.3.1. Modo de operação

Os ensaios em sistema descontínuo foram realizados à pressão atmosférica, em reactores cilíndricos de vidro de parede dupla (25 mL), a uma temperatura de 30°C e sob agitação magnética (Figura 11). A temperatura foi mantida durante a reacção através de um circuito fechado de circulação constante de água pela parede interna do reactor. A água é proveniente de um banho termoestabilizado, que é mantido à temperatura pretendida para a reacção.

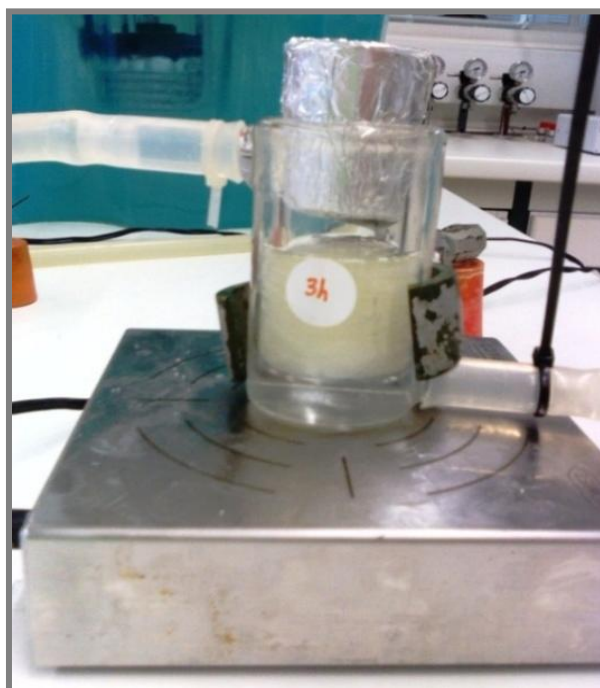


Figura 11 – Reactor de vidro de parede dupla sobre agitador magnético.
(reacção de transesterificação em sistema descontínuo)

Para a enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, realizaram-se seis ensaios, para os tempos de reacção 3, 6, 9, 24, 30 e 48 h. Para a enzima imobilizada em Accurel MP 1000, realizaram-se quatro ensaios, para os tempos de reacção 3, 6, 24 e 48 h. Cada tempo de reacção corresponde pois, a uma reacção independente em cada reactor.

O meio reaccional foi constituído por: óleo, catalisador (enzima imobilizada), metanol dissolvido em meio aquoso em proporções pré-definidas, determinadas em função das razões molares utilizadas. Assim, o meio reaccional foi constituído pelo seguinte sistema bifásico: 5 mL de óleo de cardo bruto, 1,21 mL de metanol (correspondente a 2M no sistema bifásico) e 10 mL de solução tampão fosfato pH 6,5, 50 mM, corresponde a uma razão molar global de 5,9:1 (metanol:óleo) e a uma percentagem de 30% (m/v) de óleo no total da emulsão. A quantidade de enzima imobilizada utilizada nos ensaios foi 10% relativamente ao óleo. Os reactores, depois de devidamente preparados, são tapados com uma rolha forrada com alumínio de forma a minimizar a evaporação de metanol. Como já foi referido, o tempo de cada reacção variou conforme o ensaio.

3.2.3.2 Recolha de amostras e recuperação da enzima imobilizada para reutilização

Ao fim de cada tempo de reacção, recolheu-se todo o conteúdo do reactor (meio reaccional e enzima) para um balão de Erlenmeyer com 10 mL de *n*-hexano. Agitou-se bem a mistura e filtrou-se a vácuo de forma a recuperar a enzima. A enzima foi novamente lavada com mais 5 mL de *n*-hexano. O filtrado foi centrifugado a 10 000 rpm, durante 10 minutos, de forma a separar a fase orgânica da aquosa para análise dos produtos da reacção presentes na fase orgânica.

Através da centrifugação, conseguiu separar-se as duas fases: o sobrenadante (fase orgânica), onde se encontram os monoacilgliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis, os ácidos gordos, e os ésteres metílicos (biodiesel); e a fase inferior, onde estão os componentes hidrossolúveis da reacção (o glicerol e o metanol residual). Com recurso a uma pipeta de Pasteur recolheu-se o sobrenadante para um frasco de vidro escuro específico para armazenar a amostra no congelador a -18°C até se proceder à sua análise. O frasco foi devidamente identificado com o ensaio correspondente.

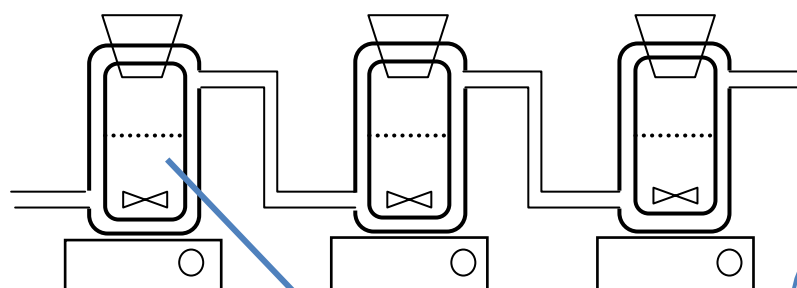
Foi realizada a recuperação da enzima imobilizada, pois como a actividade catalítica se mantém é possível a reutilização nos ensaios seguintes, desde que devidamente conservada. Como já foi referido, com a filtração a vácuo separou-se o meio reaccional, que foi centrifugado, da enzima imobilizada em suporte. A enzima imobilizada que ficou depositada no papel de filtro, foi lavada com solução tampão pH 6,5 contendo 4M de

metanol e depois removida do filtro. Para conservar a enzima imobilizada devidamente, antes de nova utilização, guardou-se no frigorífico a 4°C em solução tampão com 4M de metanol. Quando foi necessário reutilizá-la, bastou filtrar-se a vácuo para remover a solução tampão antes de ser colocada no novo reactor, para novo ensaio.

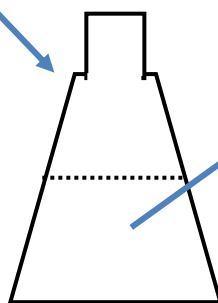
Na

Figura 12, podemos visualizar todo o esquema geral do processo de produção de biodiesel em sistema descontínuo.

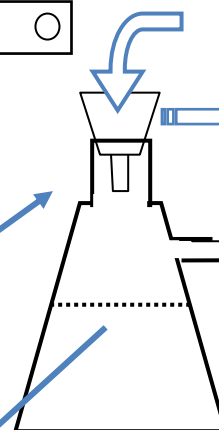
A. Reactores descontínuos, com agitação magnética do meio reaccional



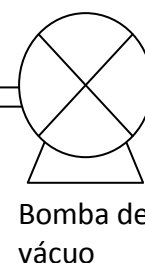
B. Recolha do meio reaccional para Erlenmeyer com 10 mL de *n*-hexano



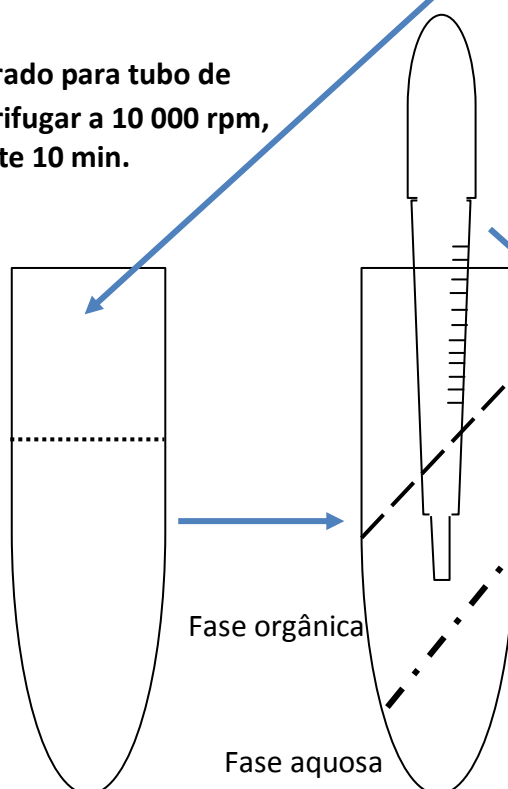
C. Filtração a vácuo e lavagem da enzima imobilizada com 5mL de *n*-hexano



D. Retirar enzima imobilizada do papel de filtro e armazenar



E. Passar filtrado para tubo de centrífuga. Centrifugar a 10 000 rpm, durante 10 min.



F. Recolher sobrenadante com pipeta de Pasteur e armazenar amostra em frasco de recolha

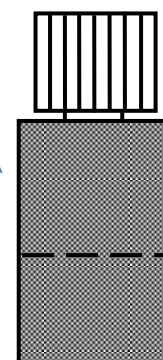


Figura 12 - Esquema de produção de biodiesel em sistema descontínuo

3.2.4. Produção de biodiesel em sistema contínuo

O reactor de leito fixo consiste numa coluna cilíndrica de parede dupla, colocada na vertical e preenchida com as partículas do biocatalisador. A alimentação foi feita pela parte superior da coluna. O movimento permanente do substrato através do leito contendo as enzimas imobilizadas permite obter velocidades de reacção elevadas resultantes de uma elevada concentração do biocatalisador. Apresenta ainda como vantagem uma destruição mínima das partículas do biocatalisador, devido à fraca abrasão resultante do atrito, quando comparada com a observada nos reactores com agitação magnética (Osório, 2008).

Os ensaios foram realizados numa coluna de vidro de parede dupla (16,5 cm de altura e 1 cm de diâmetro interno) com uma placa de vidro poroso G2 na base para retenção do biocatalisador (reactor).

3.2.4.1. Modo de operação

Nos ensaios com Lewatit VP OC 1600, a coluna foi cheia com 10 g de enzima imobilizada, enquanto no ensaio com Accurel MP 1000, se utilizaram apenas 3 g de biocatalisador. Estas massas de biocatalisador correspondem a igual volume aparente de leito de 12,2 cm³. Em todos os ensaios, o meio reaccional foi constituído pela seguinte emulsão: óleo de cardo, solução tampão pH 7,0 contendo metanol 3M, nas proporções determinadas (Anexo II). Para a coluna com a lipase/aciltransferase imobilizada em Lewatit VP OC 1600, realizou-se um ensaio com 10 % (m/v) de óleo na emulsão, e outro com nova carga de enzima imobilizada, com 20 % (m/v) de óleo na emulsão; com a enzima imobilizada em Accurel MP 1000 realizou-se apenas o ensaio com 20 % (m/v) de óleo na emulsão. A emulsão, depois de bem homogeneizada num agitador Ultra-Turrax, foi colocada num balão dentro do banho termoestatizado a 30°C, onde se manteve sob agitação contínua ao longo dos ensaios.

A temperatura de reacção foi alcançada e mantida através da circulação da água do banho termoestatizado (30°C), num circuito fechado no interior da parede dupla do reactor.

O reactor funcionou com leito fixo com alimentação em fluxo descendente. Os tempos de residência do meio reaccional foram estabelecidos através do controlo dos caudais, de acordo com a equação seguinte:

$$\tau = \frac{V}{Q}$$

(Eq. 2)

Onde τ significa o tempo de residência; V o volume útil da coluna e Q caudal de circulação do meio reaccional.

Utilizaram-se duas bombas peristálticas para controlo dos fluxos de entrada e de saída da emulsão, (Figura 13). A bomba peristáltica, que fazia a bombagem do meio reaccional para o topo do reactor e controlava também a saída do meio reaccional da coluna, operou a um caudal de 5 mL/min; a outra bomba foi ligada à entrada do reactor, em série com a primeira bomba, a um caudal de 1 mL/min, de modo a compensar a perda de carga sofrida durante o percurso ascendente (Figura 13). Utilizou-se, para a passagem da emulsão ao longo do sistema, um tubo com especificações próprias e resistentes aos EMAG (Tubo Tygon F4040A).

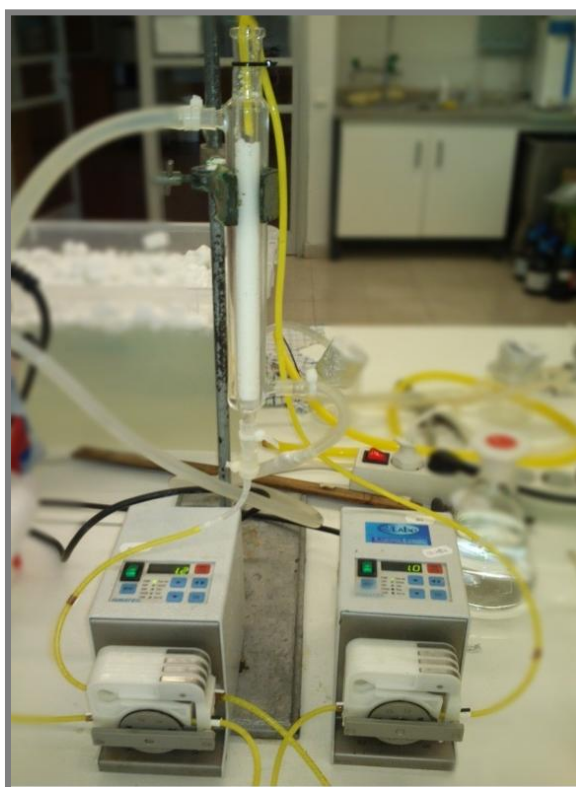


Figura 13 - Reactor contínuo com enzima imobilizada e bombas de controlo de caudal.

Na Figura 14, podemos ver o sistema completo:

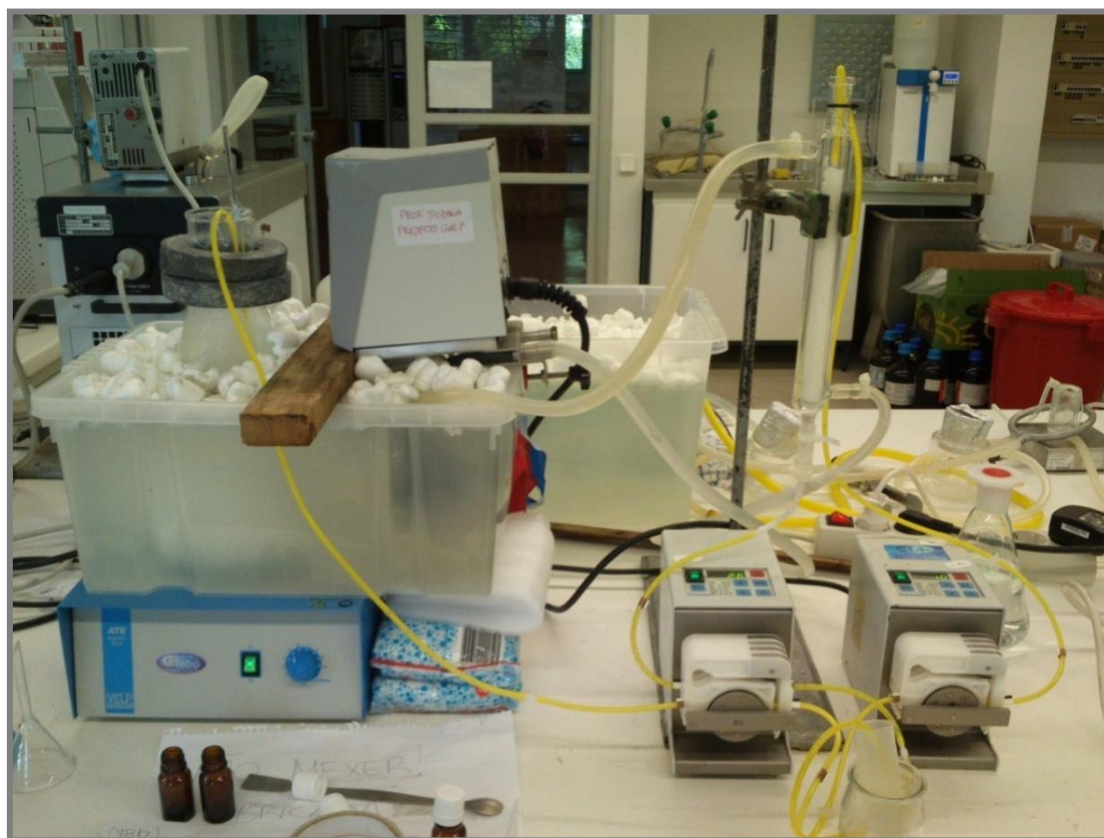


Figura 14 - Sistema contínuo de produção de biodiesel.

3.2.4.2. Recolha de amostras

Como pode visualizar-se na Figura 14, a recolha das amostras foi feita pela parte inferior da coluna de extracção, onde foi colocado um recipiente, para a recolha contínua do produto da reacção. Ao longo dos vários ensaios foram recolhidas diariamente, várias tomas do meio reaccional para tubos de centrífuga, que posteriormente foram centrifugadas, a 10.000 rpm, durante 10 min., para conseguir separar-se a fase orgânica da aquosa. Com a ajuda de uma pipeta de Pasteur recolheu-se, o sobrenadante, de maneira a não arrastar os componentes hidrossolúveis da reacção, que se depositaram na fase inferior do tubo, que se colocou num frasco de recolha específico, a - 18°C até análise posterior.

Na Figura 15, podemos visualizar todo o esquema geral do processo de produção de biodiesel em sistema contínuo:

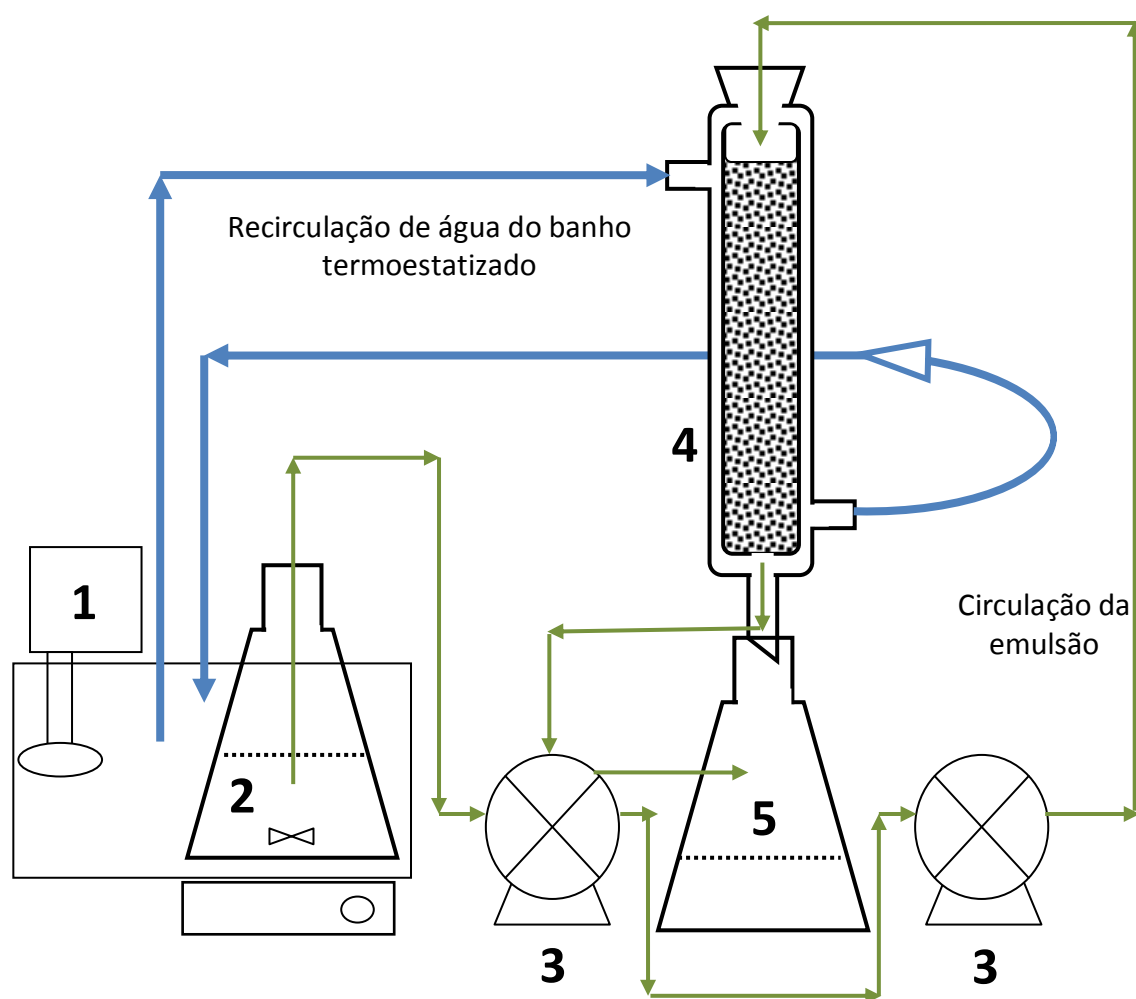


Figura 15 - Esquema do sistema em contínuo com reactor de leito fixo (1 – cabeça de aquecimento de banho termostático; 2 – Balão de Erlenmeyer com meio reaccional (emulsão de óleo em fase aquosa com metanol) sob agitação magnética constante; 3 – bombas peristálticas Ismatec; 4 – Coluna de parede dupla, de diâmetro interno 1,5cm e altura 16,5cm, com enzima imobilizada (reactor); 5 – recolha do produto de reacção à saída da coluna).

3.2.5. Análise dos produtos de reacção

A análise dos produtos de reacção foi idêntica para todos os ensaios, quer do sistema descontínuo, quer do contínuo. A técnica utilizada foi a cromatografia em camada fina.

Esta técnica divide-se em três etapas:

1. Preparação das placas de sílica-gel: primeiro mediu-se a placa e dividiu-se em três colunas verticais, com auxílio de uma espátula metálica, para que não ocorra contaminação de amostra de uma coluna para a outra. Na parte inferior traça-se com lápis uma linha horizontal a 1,5 cm de altura, relativamente à base da placa, para deposição da amostra (Figura 16).
2. Preparação da amostra a analisar: retiraram-se 100 μL de amostra que se diluiu em 900 μL de *n*-hexano. Com recurso a uma seringa de cromatografia, depositou-se uma banda contínua de 100 μL , da solução contendo a amostra (é aconselhável colocar 50 μL de cada vez) (Figura 16).

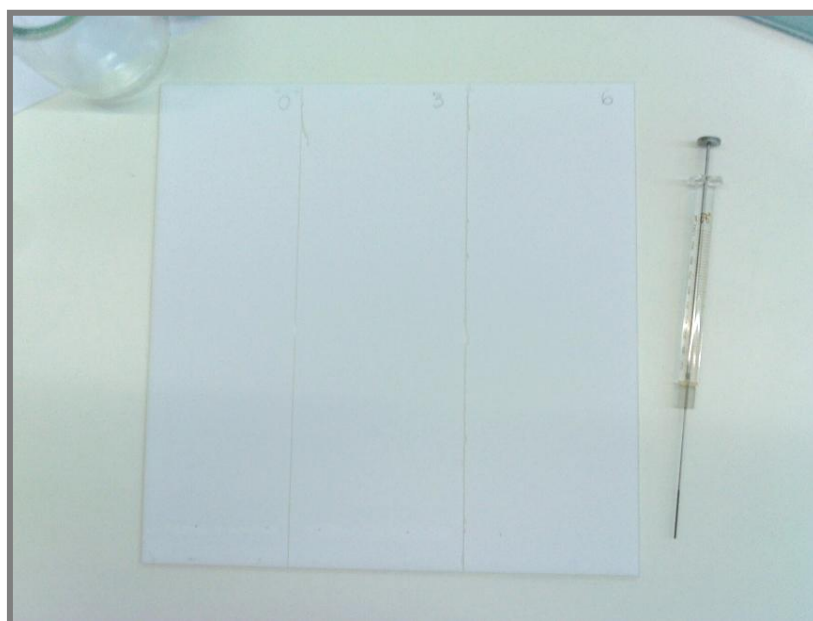


Figura 16 - Placa de sílica-gel dividida em colunas iguais e seringa para depositar a solução contendo a amostra

3. Preparação da fase móvel: prepararam-se 100 mL de solução de éter de petróleo, éter etílico e ácido acético, numa proporção de 85:15:1 (v/v/v), que se colocaram numa tina cromatográfica de vidro 22x20x10 cm (Costa, 1994). O líquido vai ascender através das

placas permitindo a separação dos diferentes grupos de componentes presentes por bandas distintas.

Para conseguirmos visualizar e identificar as diferentes bandas presentes nas placas, após o seu desenvolvimento, é necessário pulverizá-las com uma solução alcoólica de diclorofluoresceína (2% 2':7' – diclorofluoresceína em 95% de etanol) e visualizá-las na presença de luz ultravioleta a 366 nm (Figura 17).

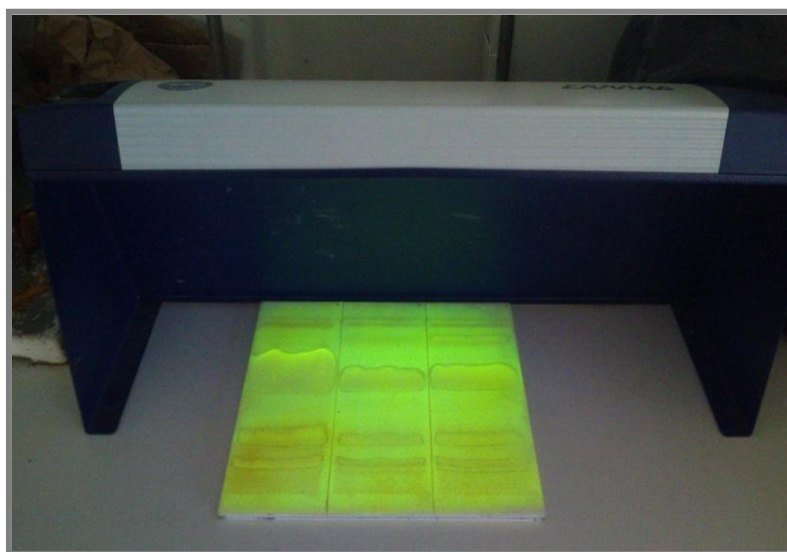


Figura 17 - Placa de sílica gel pulverizada com solução alcoólica de diclorofluoresceína, visualizadas sob luz ultravioleta a 366 nm.

Na primeira coluna de cada placa, deposita-se o tempo zero (óleo de cardo dissolvido em *n*-hexano), que serve de padrão para os restantes tempos. O óleo de cardo é formado por monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG), ácidos gordos livre (AGL) e triacilgliceróis (TAG) identificáveis na placa de camada fina segundo esta ordem, da base para o topo da placa. Assim, nas restantes amostras, os compostos estarão colocados na mesma linha horizontal ou ausentes quando consumidos. Acima dos triacilgliceróis surgem os ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) o que se pretendia produzir com este estudo.

Para ser mais fácil a identificação e posterior medição das áreas das bandas, delineou-se cada uma das bandas a lápis, pela seguinte ordem: DAG, AGL, TAG e EMAG; de baixo para cima (Figura 18).

Procedeu-se à cópia das placas para papel vegetal e as áreas dos compostos foram medidos no equipamento Leica Microsystems disponibilizado pelo Departamento de Engenharia Florestal. Os valores obtidos com esta medição não ofereceram uma unidade

específica, mas permitem determinar as percentagens de cada um dos compostos relativamente aos outros.

Os resultados de MAG, presentes junto à banda onde a solução foi depositada, foram ignorados, devido à sua inconstante presença e baixo teor.

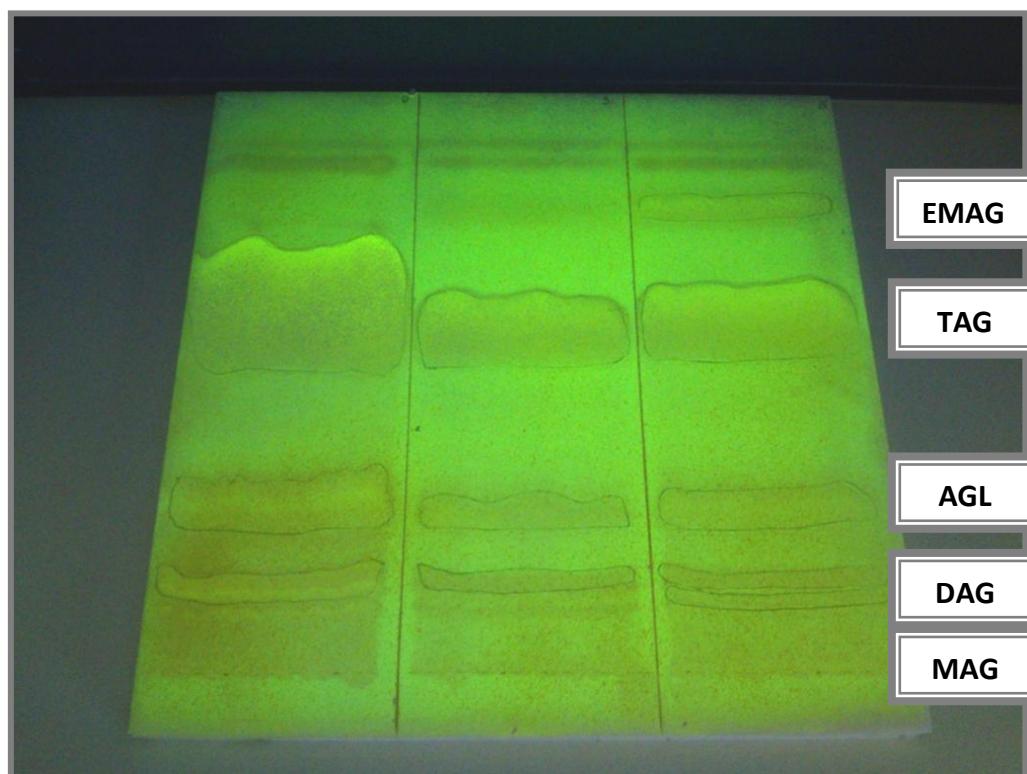


Figura 18 - Exemplo de uma placa de cromatografia com as diferentes bandas dos constituintes da amostra: monoacilgliceróis (MAG), diacilgliceróis (DAG), triacilgliceróis (TAG) e ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG), nos tempos 0, 3 e 6 h de reacção de transesterificação em descontínuo.

Através da análise das áreas das placas de cromatografia, foi possível observar uma evolução na produção ésteres metílicos de ácidos gordos ao longo do tempo, nos diferentes ensaios.

Numa tentativa de quantificar os produtos de reacção, foi estabelecido um critério para tratamento de dados, similar para todos os ensaios.

Em primeiro lugar, foi determinada a percentagem de área de cada constituinte, para cada tempo do ensaio, através da relação com o total das áreas de cada coluna das placas cromatográficas correspondente aos diversos compostos aí representados:

$$\% \text{ Área do composto} = \frac{\text{área do composto no tempo } t \times 100\%}{\text{área da totalidade dos compostos no tempo } t}$$

(Eq. 3)

Depois, foram estabelecidas relações entre os teores de diacilgliceróis (DAG), ácidos gordos livres (AGL), triacilgliceróis (TAG) e ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) e as respectivas áreas nas placas. Os modelos de cálculo apresentados em seguida foram adoptados para todos os ensaios.

Estabeleceu-se uma relação para as áreas dos ácidos gordos livres (AGL) com base na determinação da acidez do óleo por titulação. Deste modo, ao conhecermos a acidez, conhecemos a percentagem de ácidos gordos livres presentes no óleo, isto é, no tempo zero do ensaio. Pegando nesses dados, com um simples cálculo foi possível chegar aos valores de AGL ao longo do ensaio:

$$AGL(\% \text{ m/m}) = \frac{\% \text{ área no tempo } t \times \% \text{ AGL no tempo zero}}{\% \text{ área no tempo zero}}$$

(Eq. 4)

Para a determinação da percentagem de diacilgliceróis (DAG) recorreu-se à relação previamente estabelecida por Sengo (2010), através da qual se verificou que a deposição de 100 µL de uma solução com 0,5 % de DAG, corresponde a uma área de 1406,11 mm², pelo que basta estabelecer uma relação com as áreas obtidas para se determinar a percentagem de DAG presente para cada tempo. Para tal, foi usada a seguinte formula:

$$DAG (\% \text{ m/m}) = \frac{\text{área de DAG no tempo } t \times 0,5}{\text{área de DAG no tempo zero}}$$

(Eq. 5)

O óleo inicial, isto é, no tempo zero, não possui ésteres metílicos de ácidos gordos pois estes resultam da reacção de transesterificação do óleo com o metanol e o teor de MAG é desprezável. Assim, na coluna do tempo zero só estão presente os ácidos gordos livres (AGL), diacilgliceróis (DAG) e triacilgliceróis (TAG). Como, já conhecemos os valores de

AGL e DAG, foi possível estimar a percentagem de TAG no tempo zero presente em cada tempo, segundo a seguinte equação:

$$\% \text{ TAG no tempo zero} = 100 - \% \text{ massa AGL} - \% \text{ massa DAG} \quad (\text{Eq. 6})$$

Depois, para os outros tempos do ensaio bastou estabelecer uma relação entre o tempo zero e o tempo em estudo, seguindo o seguinte cálculo:

$$\text{TAG } (\% \text{ m/m}) = \frac{\% \text{ área TAG no tempo } t \times \% \text{ massa TAG tempo zero}}{\% \text{ área TAG no tempo zero}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Por último, os ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) foram calculados através da seguinte equação:

$$\text{EMAG } (\% \text{ m/m}) = 100 - \% \text{ massa TAG} - \% \text{ massa AGL} - \% \text{ massa DAG} \quad (\text{Eq. 8})$$

A partir dos resultados destes cálculos e sua organização, construímos gráficos para cada ensaio, sendo assim possível monitorizar e avaliar a reacção de transesterificação de óleo de cardo bruto com metanol, catalisada enzimaticamente, num meio reaccional bifásico orgânico/aquoso, em sistemas descontínuo ou contínuo.

3.2.6. Extracção do biodiesel do meio reaccional.

A solução obtida dos diferentes ensaios foi decantada, em ampolas de decantação, para separar as duas fases, fase orgânica (biodiesel) e aquosa (glicerol e metanol). Adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica para remoção de água residual. Por fim, as amostras recolhidas foram armazenadas a -18°C para posteriores análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Imobilização da enzima em Lewatit VP OC 1600 - Doseamento de proteína pelo método de Bradford

Na Figura 19 pode observar-se a curva de calibração obtida pelo método de Bradford que permitiu calcular a concentração total de proteína (mg/mL) nas amostras analisadas (Anexo III):

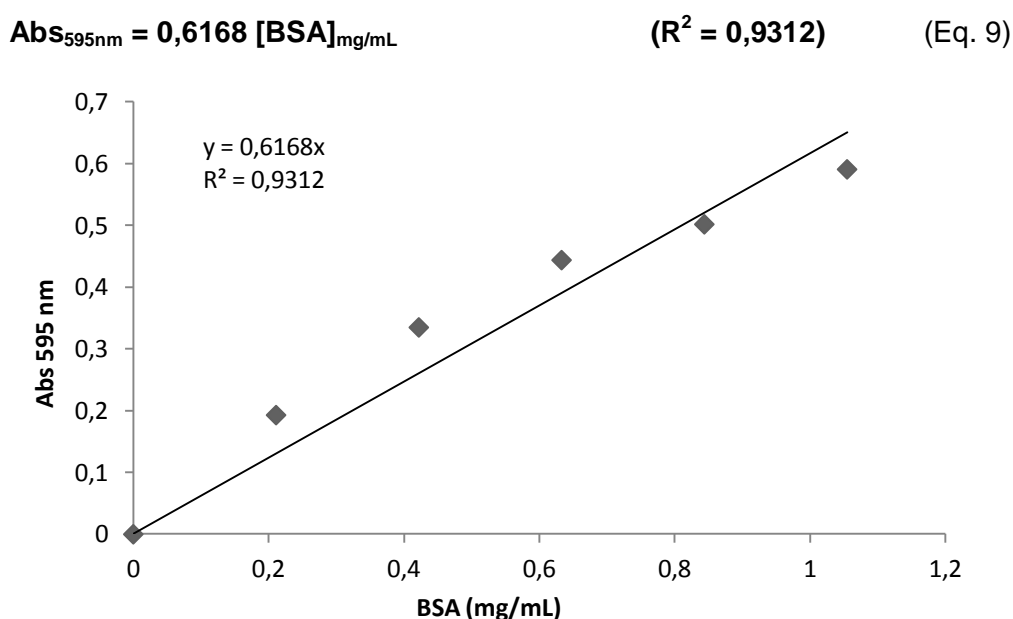


Figura 19 - Curva de calibração obtida pelo método de Bradford, 1976.

Após as leituras das absorvâncias de cada amostra através da equação 9, obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 8 (Anexo III) para as várias soluções obtidas em cada imobilização a resina nova (massa total de Lewatit VP OC 1600 = 1,476 g).

Por último, com os resultados obtidos das três imobilizações conseguiu calcular-se o total de proteína imobilizada e o rendimento global da imobilização em 4,428 g de suporte.

Concluindo, conseguiu-se recuperar 92,2% da proteína, que correspondeu a uma carga média de 10,05 mg/g de suporte, apesar da carga no suporte variar entre 2,37 e 25,0 mg/g. O facto de na 2ª e 3ª imobilizações ter-se obtido um baixo rendimento de imobilização, tal pode ser explicado por uma isotérmica de adsorção desfavorável da enzima ao suporte. São necessárias concentrações de proteína elevadas na solução inicial para favorecer a adsorção.

Tabela 8 - Resultados obtidos para as quantidades de proteína imobilizadas e rendimentos das 3 imobilizações.

Solução inicial	Proteína livre = 48,23 mg
1ª Imobilização	Proteína imobilizada = 37,02 mg
	Proteína imobilizada/g suporte = 25,08 mg/g
	Rendimento da 1ª imobilização = 76,76%
2ª Imobilização no filtrado da 1ª imobilização	Proteína imobilizada = 3,97 mg
	Proteína imobilizada/g suporte = 2,69 mg/g
	Rendimento da 2ª imobilização = 36,52%
3ª Imobilização no filtrado da 2ª imobilização	Proteína imobilizada = 3,50 mg
	Proteína imobilizada/g suporte = 2,37 mg/g
	Rendimento da 3ª imobilização = 50,66%
Proteína total imobilizada	44,49 mg
Proteína total imobilizada/g suporte	10,05 mg/g de suporte
Rendimento global da imobilização	92,24%

4.2. Produção de biodiesel

A produção de biodiesel foi realizada a partir de óleo de cardo com 1,3% de AGL, por transesterificação com metanol catalisada pela enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e em Accurel MP 1000, foram testadas duas percentagens de óleo em solução (10 e 20%).

Quanto ao método de análise dos produtos de reacção, é de salientar que é pouco preciso e que apresenta algumas limitações. A técnica de cromatografia em camada fina, é complementada com posterior análise e medição das áreas dos compostos num aparelho específico, esta medição é feita digitalmente e está sujeita a erros de delimitação e medição. As áreas obtidas a partir de cada banda não são equivalentes em termos de quantidades para diferentes grupos de compostos.

Como no decorrer deste trabalho, não se dispôs de um método de análise alternativo, pressupôs-se que o coeficiente de proporcionalidade entre as áreas e as quantidades eram iguais para os diferentes grupos de compostos, o que não é correcto.

Para uma análise mais exacta, poderia recorrer-se à técnica mais rigorosa da cromatografia gasosa capilar de alta temperatura, pois esta separa os compostos através da deslocação

dos mesmos através de uma coluna numa corrente de gás inerte (fase móvel) no final do qual são detectados e quantificados os compostos químicos electronicamente contudo, não foi possível implementar atempadamente a técnica de cromatografia capilar para análise destas amostras.

Porém, com os recursos disponíveis, conseguiu-se comparar diferentes ensaios, uma vez que se recorreu sempre à mesma metodologia analítica.

4.1.2. Produção de biodiesel em sistema descontínuo

Em sistema descontínuo, a produção de biodiesel (ésteres metílicos de ácidos gordos) foi catalisada com enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e em Accurel MP 1000 e a percentagem de óleo correspondia a 10% da emulsão. Para a enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600 realizaram-se seis ensaios diferentes, cada um correspondente a tempos diferentes de reacção (3, 6, 9, 24, 30 e 48 h) e para a enzima imobilizada em Accurel MP 1000 realizaram-se 4 ensaios (3, 6, 24 e 48 h).

Os resultados obtidos da reacção com enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600 são apresentados na Figura 20, evidenciando a forma como os compostos variam ao longo do tempo nestas condições e, em particular, a concentração de ésteres metílicos de ácidos gordos presentes no fim da reacção (Anexo IV).

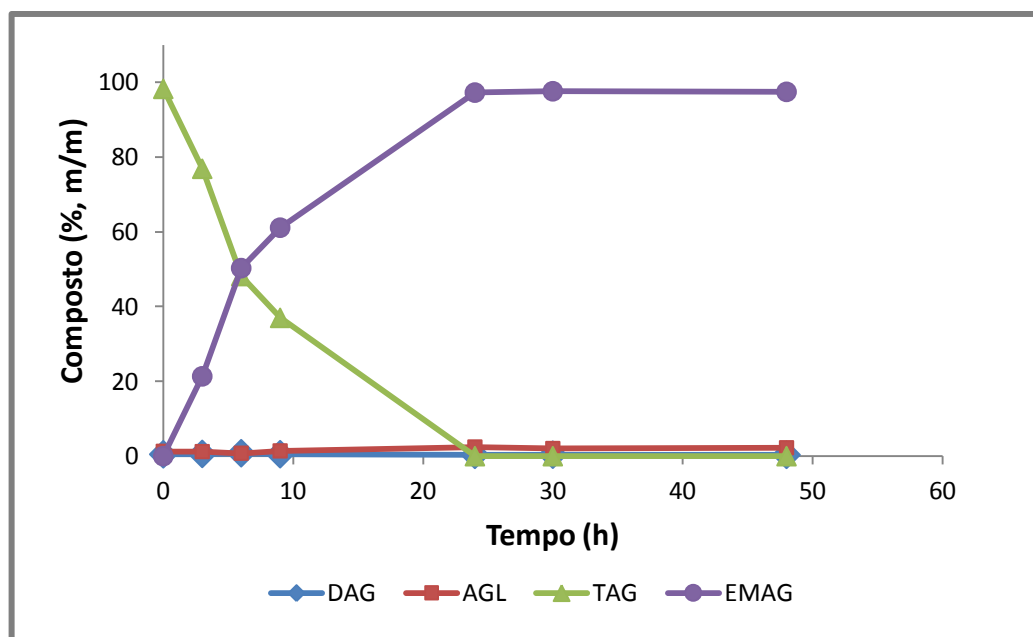


Figura 20 - Produção de biodiesel em sistema descontínuo, catalisada por enzima imobilizada em Lewatit ao longo de 48 horas de reacção.

Pela análise dos resultados, apresentados na Figura 20, pode concluir-se que:

- A enzima imobilizada no suporte Lewatit VP OC 1600 foi capaz de catalisar a transesterificação de óleo de cardo com metanol, em meio bifásico orgânico/aquoso, conseguindo-se uma taxa de conversão em EMAG bastante elevada;
- Após 10 h de reacção os EMAG apresentavam já 60% do total dos compostos e após 24 h a conversão foi praticamente completo.
- A produção de EMAG parece resultar, maioritariamente, do consumo de triacilgliceróis (TAG) e de diacilgliceróis (DAG), verificando-se uma diminuição destes compostos ao longo do tempo, à medida que a concentração de EMAG aumenta.
- Os valores de ácidos gordos livres (AGL) não variam muito ao longo do tempo, mantendo-se em valores da ordem de 1%.
- A partir das 24 horas de reacção, verifica-se um rendimento bastante elevado de EMAG, cerca de 97%, o que é muito positivo uma vez que, sob as condições em que foi realizado, o rendimento ultrapassou o mínimo de EMAG estipulado na Norma Europeia EN-14214 (2009) para biodiesel depois de purificado. A Norma Europeia obriga a uma presença no mínimo de 96,5% de ésteres metílicos de ácidos gordos no biodiesel produzido a partir de óleo de sementes de cardo. Esta norma indica, também, que os DAG e os TAG não excedam mais de 0,2% no biodiesel, o que não acontece com os resultados deste estudo, contudo este biodiesel ainda não foi purificado;

Seguidamente, na Figura 21 apresentam-se os resultados obtidos pela reacção com enzima imobilizada em Accurel MP 1000 (Anexo IV):

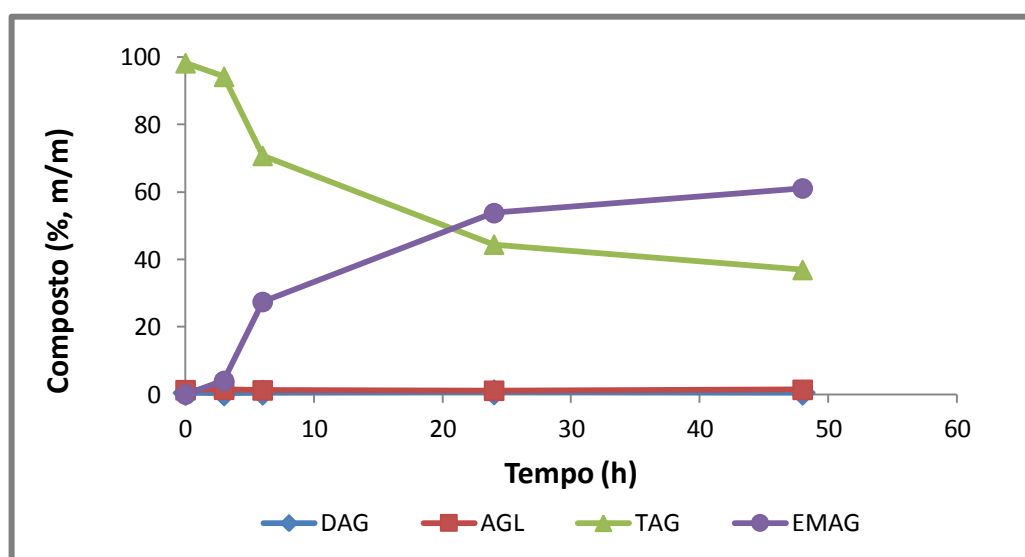


Figura 21 - Produção de biodiesel em sistema descontínuo, catalisada por enzima imobilizada em Accurel ao longo de 48 horas de reacção

Pela análise dos resultados, apresentados na Figura 21, conclui-se que:

- A enzima imobilizada no suporte Accurel MP 1000 também foi capaz de catalisar a transesterificação de óleo de cardo com metanol, em meio bifásico orgânico/aquoso;
- Os valores de ácidos gordos livres (AGL) não variaram ao longo do tempo, à semelhança do observado com a enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600;
- Os valores de DAG foram quase inexistentes;
- A produção de EMAG resulta pois maioritariamente, do consumo de TAG;
- Verifica-se que a reacção com este suporte foi mais lenta, e a taxa de conversão em EMAG foi menor e atingiram-se menores quantidades de EMAG ao fim de mais tempo, relativamente ao que acontece com o suporte Lewatit, por exemplo: ao fim de 3 horas, com enzima imobilizada em Accurel a presença de EMAG era muito baixa (cerca de 3%), por outro lado na reacção com enzima imobilizada em Lewatit atingiram-se aproximadamente rendimentos de 20% em EMAG. Após 48 horas de reacção conseguiu-se 97% de EMAG quando a enzima foi imobilizada em Lewatit VP

OC 1600, enquanto na presente reacção, o máximo atingido foi na ordem dos 60% de EMAG;

- Ao contrário do que aconteceu na reacção com enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, ao fim de 24 horas, os TAG não foram todos convertidos em EMAG. Teria sido interessante prolongar os ensaios avaliar quando se atinge o equilíbrio e o grau da conversão obtida. Contudo, tempos de reacção elevados não têm interesse do ponto de vista industrial;

Conclui-se que para o sistema descontínuo é mais vantajoso utilizar na reacção enzima imobilizada em Lewatit VPOC 1600 do que em Accurel MP 1000, já que obtemos melhores resultados em menos tempo.

A lipase/aciltransferase de *C. parapsilosis* imobilizada em Accurel MP 1000 já tinha sido testada como catalisador de interesterificação de gorduras em meio orgânico, em reactor descontínuo e em reactor contínuo de leito fluidizado (Osório *et al.*, 2009 a; Osório *et al.*, 2009 b) e da acidólise de tripalmitina com ácido oleico livre e ácidos gordos polinsaturados ómega-3 para produção de sucedâneos de gordura de leite humano (Tecalão *et. al*, 2010). Neste último sistema, a enzima apenas foi capaz de incorporar cerca de 8,5 - 9% de ácidos livres na tripalmitina, confirmando o carácter de aciltransferase desta enzima e a sua preferência por TAG relativamente aos AGL.

Nos vários estudos realizados sobre produção de biodiesel por catálise enzimática, têm sido adoptadas várias estratégias para a optimização do sistema, melhoria da actividade e estabilidade operacional da enzima, redução do tempo de reacção e conseguir uma elevada conversão em EMAG.

Tem-se tentado reunir as condições óptimas, controlando variáveis como a temperatura, o tempo de reacção, a agitação da emulsão, a fonte da lipase, o tipo de suporte e métodos utilizados para a imobilização, o solvente, a fonte de óleo, o seu grau de pureza e a razão molar (óleo:álcool).

Kumari *et al.* (2009), conseguiram uma conversão em EMAG de 94% em 60 horas de reacção a 30°C,. a partir de óleo de *Jatropha*, por transesterificação com metanol e em presença de *t*-butanol catalisada pela lipase *Enterobacter aerogenes* imobilizada em sílica activada. A razão molar utilizada foi de 1:2 (óleo:metanol) e *t*-butanol numa razão de 0,2 do volume de óleo.

Geralmente, na transesterificação do óleo de *Jatropha* utiliza-se etanol por ter menos efeito na inactivação enzimática. O *t*-butanol influenciou fortemente a síntese de biodiesel uma vez que na sua ausência não houve conversão em EMAG. Tal pode dever-se à inibição da lipase pelo metanol, na medida em que a utilização de álcoois com número superior a três carbonos são utilizados para aumentar a actividade da lipase para a síntese de EMAG (Shah *et al.* 2004 a, Shah *et al.* 2007 b; Wu e Chen 2002 a, Wu e Chen 2003 b). O *t*-butanol também pode ter a vantagem de atenuar os efeitos negativos causados pelo metanol e pelo glicerol, sob a lipase, pela sua capacidade de dissolver estes compostos (Dossat *et al.* 1999; Watanabe *et al.* 2000).

No presente trabalho, conseguiu-se obter uma conversão em EMAG superior (97%), ao fim de 24 horas de reacção em sistema descontínuo com 10% (m/v) de óleo na emulsão com a lipase de *Candida parapsilosis* imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e com uma razão molar na emulsão de 1:5,9 (óleo:metanol), logo em menos tempo que Kumari *et al.* (2009). Estes resultados foram obtidos sem necessidade de recorrer à utilização do *t*-butanol para aumentar a actividade da lipase. No nosso sistema, a presença de metanol numa fase aquosa em contacto com o óleo vai impedir o contacto directo do álcool com a enzima, aumentando a sua actividade e estabilidade.

Na transesterificação de óleos de soja, colza e de um óleo muito ácido com metanol, em meio sem solvente, obtiveram-se rendimentos em EMAG superiores a 90%, após 24 h de reacção, quando se utilizou a lipase comercial imobilizada de *Candida antarctica* (Novozym 435) como catalisador da reacção (Shimada *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 2002 a; Watanabe *et al.*, 2007 b; Dizge, Keskinler, 2008)

4.1.3. Produção de biodiesel em sistema contínuo

Em sistema contínuo foram realizados três ensaios, dois catalisados com enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, testando primeiro uma percentagem de óleo correspondente a 10% da emulsão e outro com uma percentagem de óleo correspondente a 20% da emulsão. No terceiro ensaio realizado, testou-se o comportamento da enzima imobilizada em Accurel MP 1000 com uma percentagem de óleo de 20% e em presença de um sistema bifásico e 3M de metanol.

Nas Figura 22, Figura 23 e Figura 24 são apresentados os resultados dos ensaios em contínuo, com a respectiva análise e dificuldades sentidas ao longo do processo (Anexo V e VI):

Produção de biodiesel em sistema contínuo com enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600

Ensaio 1: contendo 10% de óleo (m/v)

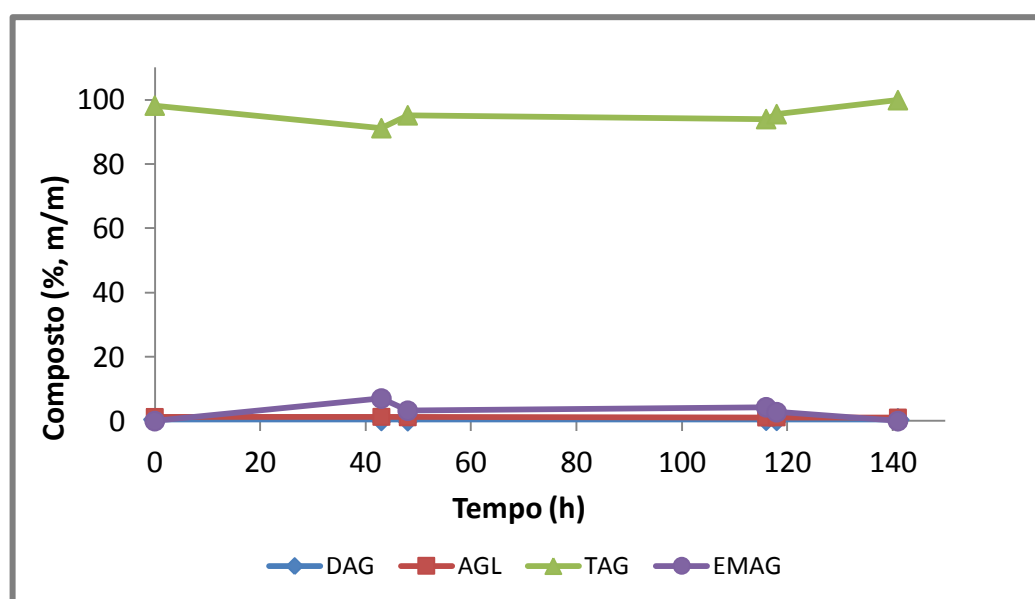


Figura 22 - Produção de biodiesel em sistema contínuo, catalisada por enzima imobilizada em Lewatit, com 10% de óleo (m/v) ao longo de 141 horas de reacção

Através da análise da figura 22, pode concluir-se que:

- A enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600 utilizada, em reactor contínuo, foi capaz de catalisar a reacção, em meio bifásico orgânico/aquoso, mas de uma forma muito menos eficiente do que em reactor descontínuo;
- Os valores de ácidos gordos livres (AGL) não variaram muito ao longo do tempo;
- A produção de EMAG que resultou maioritariamente, do consumo de TAG, foi de apenas 7% ao longo das primeiras 120 h de operação;
- Após cerca de 140 horas de reacção a actividade da enzima cessou.

• **Ensaio 2: contendo 20% de óleo (m/v)**

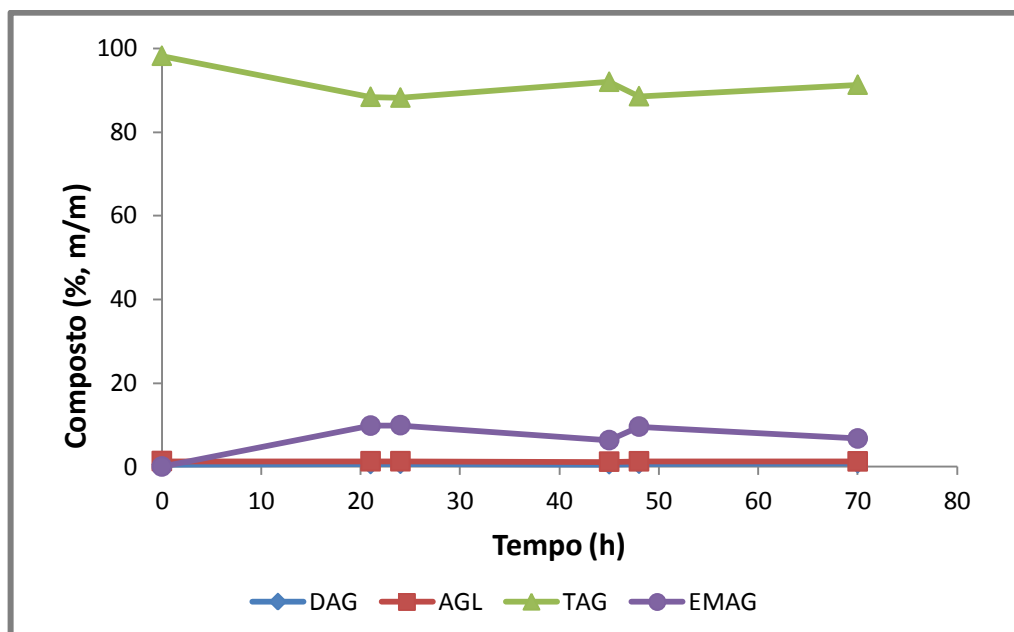


Figura 23 - Produção de biodiesel em sistema contínuo, catalisada por enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, com 20% de óleo (m/v) ao longo de 70 horas de reacção.

A figura 23 apresenta os resultados de transesterificação em contínuo catalisada pela lipase/aciltransferase imobilizada em Lewatit VP OC 1600, quando se utilizou uma concentração de 20% (m/v) de óleo de cardo na emulsão.

- O aumento da concentração de óleo de 10 para 20% (m/v) neste ensaio reflectiu-se num aumento no teor de EMAG de 7% para 10%, o qual se manteve aproximadamente constante ao longo de 70 horas de operação;
- Os valores de AGL não variaram muito ao longo do tempo (1,24%), à semelhança do ensaio em contínuo anterior;
- Igualmente a produção de EMAG resulta, maioritariamente, do consumo de TAG;
- Decidiu-se interromper o ensaio por volta das 70 horas de reacção, mesmo com a enzima ainda activa, pois embora se tenha conseguido obter maior quantidade de EMAG relativamente ao ensaio anterior, as conversões continuavam reduzidas. Observou-se uma separação de fases por densidade e o óleo acumulou-se numa camada superior do leito, enquanto a fase aquosa atravessava preferencialmente o leito fixo de enzima. Esta situação parece-nos explicar os maus resultados obtidos nos ensaios em reactor contínuo com a enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600.

Produção de biodiesel em sistema contínuo, com 20% de óleo e enzima imobilizada em Accurel MP 1000

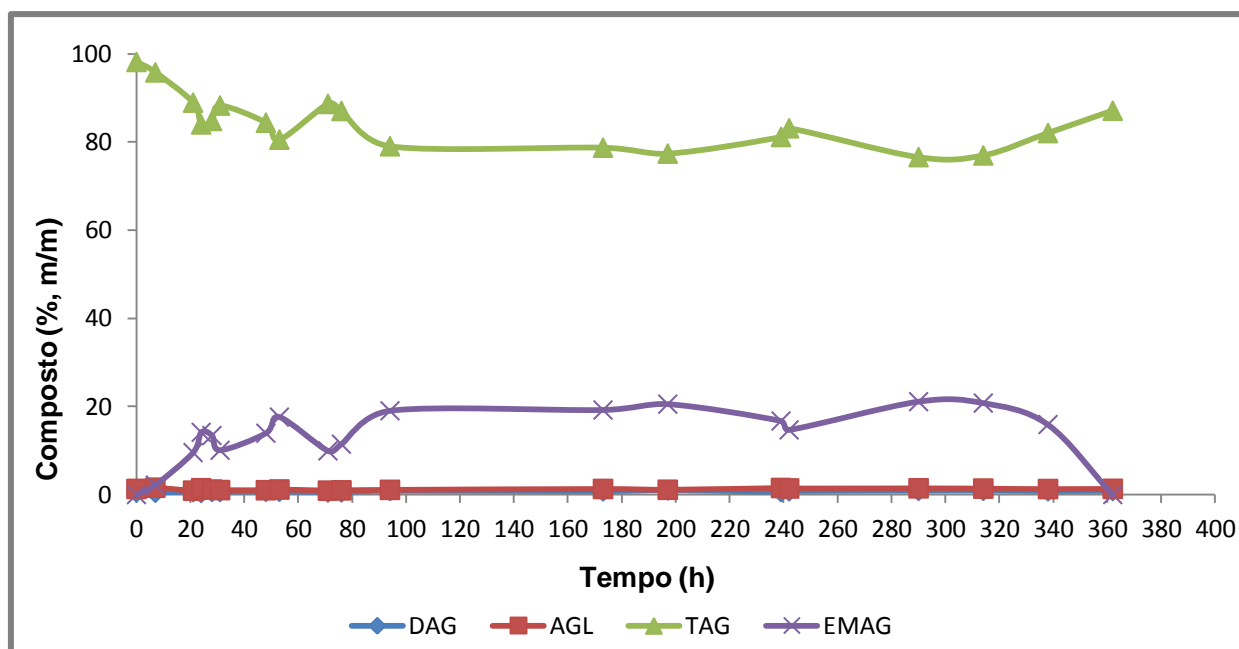


Figura 24 - Produção de biodiesel em sistema contínuo, catalisada por enzima imobilizada em Accurel MP 1000, com 20% de óleo (m/v) ao longo de 360 horas de reacção

A figura 24 apresenta os resultados de transesterificação em contínuo catalisada pela lipase/aciltransferase imobilizada em Accurel MP 1000, quando se utilizou uma concentração de 20% (m/v) de óleo de cardo na emulsão.

Tal como acontece nos ensaios anteriores verificou-se que a enzima imobilizada em Accurel MP 1000, em reactor contínuo, foi capaz de catalisar a reacção, em meio bifásico orgânico/aquoso; os valores de AGL não variaram ao longo do tempo; a produção de EMAG resulta, maioritariamente, do consumo de TAG. A conversão em EMAG neste ensaio foi superior à obtida com enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600 (atingindo-se cerca de 20%), mas ainda bastante inferior à conseguida em sistema descontínuo. Contudo, a enzima demonstrou ter uma boa estabilidade operacional mantendo-se activa cerca de 15 dias, tempo ao fim do qual deixou de haver produção de EMAG.

Contrariamente ao que ocorreu no sistema descontínuo, em que os resultados foram melhores com a enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, no sistema contínuo verificou-se maior conversão em EMAG com a enzima imobilizada em Accurel MP 1000, o que pode ser explicado pela quantidade de enzima que ficou efectivamente imobilizada em cada um dos suportes.

Sabendo a massa de cada suporte que se colocou na coluna e a carga da enzima em cada um deles, podemos calcular a quantidade de enzima presente.

Para a Lewatit VP OC 1600, colocaram-se 10 g de suporte com enzima imobilizada na coluna, que contém um total de 100 mg de proteína imobilizada (tabela 8). Para a Accurel MP 1000, pode admitir-se que, da enzima posta em contacto com o suporte, 67,2% de proteína foi imobilizada, segundo determinado por Tecelão *et al.* (2012). Neste caso, como na coluna se colocaram 3 g de suporte com enzima imobilizada (0,25 g de enzima na solução inicial/ g de suporte), admitindo o rendimento de imobilização de 67,2%, logo os 3 g de suporte que se colocaram na coluna contém 500 mg de proteína.

Embora nos ensaios com Lewatit VP OC 1600 se tenha colocado mais suporte na coluna (10 g), a quantidade efectiva de proteína presente foi de apenas 100 mg. No ensaio com Accurel MP 1000, em que se utilizaram apenas 3 g de suporte, esta resina continha 500 mg de proteína, ou seja, 5 vezes mais proteína do que no ensaio com Lewatit VP OC 1600, o que pode explicar o melhor resultado obtido no sistema contínuo com a enzima imobilizada em Accurel MP 1000.

A natureza dos suportes pode também condicionar a separação da emulsão ao longo do leito e dificultar o contacto enzima/óleo. O Accurel MP 1000 é uma matriz de polipropileno com uma área específica de 70 m²/g e um diâmetro médio de poro de 2000 Å, enquanto a Lewatit VP OC 1600 é um polímero de metacrilato reticulado por divinilbenzeno, com uma área específica de 130 m²/g e 15 Å de diâmetro médio de poro. São ambas matrizes hidrofóbicas (Tufvesson *et al.*, 2011). Um poro tão pequeno na Lewatit VP OC 1600 (15 Å) pode ser um factor limitante para a transferência de massa interna e, como tal, para o contacto enzima-substrato (óleo) no reactor contínuo. No sistema descontínuo, a agitação magnética intensa do sistema bifásico permite a manutenção da emulsão e, ao diminuir a espessura do filme de Nernst à superfície do biocatalisador, vai promover a transferência de massa interna e consequentemente o aumento da velocidade de transesterificação.

Em suma, no sistema contínuo verifica-se principalmente que a conversão em EMAG é muito reduzida. Este facto pode ser resultado de algumas adversidades tidas ao longo dos ensaios, nomeadamente em toda a logística que é preciso implementar no desenvolvimento de todo o processo. Como a reacção ocorreu ao longo de vários dias, é difícil manter as condições óptimas sempre constantes e o correcto funcionamento de todo o equipamento. Como por exemplo:

- Verificaram-se oscilações na temperatura do banho termoestabilizado por falha de corrente eléctrica, que influenciam a actividade da enzima e a homogeneidade da emulsão;
- Separação de fases (orgânica/aquosa) dentro dos tubos de circulação e consequente entrada preferencial de fase aquosa (mais densa) na coluna onde ocorre a reacção.
- Formação de percursos preferenciais de passagem da emulsão, com possível inactivação da enzima pelo metanol.
- Ao longo dos ensaios foi necessário reajustar o caudal das bombas peristálticas, devido à acumulação de emulsão no topo na coluna;
- Pelos motivos apresentados, a recolha de uma amostra representativa dos compostos presentes no meio nem sempre foi possível devido à separação de fases;
- No primeiro ensaio, as amostras retiradas do sistema não foram imediatamente analisadas, podem ter sofrido algumas alterações.

5. CONCLUSÕES

Após a realização do presente trabalho, conclui-se que:

- O óleo bruto de semente de cardo (*Cynara cardunculus* L.) revelou ser adequado para a produção de Biodiesel por catálise enzimática.
- É possível a produção de biodiesel tanto em sistema descontínuo como contínuo por transesterificação de óleo de cardo com metanol num meio bifásico orgânico/aquoso, catalisada pela lipase/aciltransferase *Candida parapsilosis*;
- Em sistema descontínuo, com enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, houve maior conversão em EMAG (cerca de 97% ao fim de 24 horas) e a reacção foi mais rápida, relativamente à reacção com enzima imobilizada em Accurel MP 1000 (cerca de 60% ao fim de 48 horas de reacção);
- No sistema em contínuo, na reacção catalisada com enzima imobilizada em Accurel MP 1000, e com 20% (m/v) de óleo na emulsão obteve-se maior conversão em EMAG (cerca de 20%) do que quando se utilizou a lipase/aciltransferase imobilizada em Lewatit VP OC 1600 (cerca de 10% de EMAG);
- Apesar das baixas conversões em EMAG observadas nos sistemas em contínuo, a lipase/aciltransferase de *C. parapsilosis* manteve a actividade catalítica durante cerca de 140 e 360 horas, respectivamente quando imobilizada em Lewatit VP OC 1600 e em Accurel MP 1000;
- Os ensaios em sistema descontínuo tiveram melhores resultados que em sistema contínuo. Tal não significa que o sistema contínuo não seja mais eficaz ou mais vantajoso se em estudos futuros as condições reaccionais forem optimizadas, assim como se se conseguirem controlar determinadas variáveis;
- Verificou-se que a produção de biodiesel por catálise enzimática não é afectada pela presença de ácidos gordos livres na matéria-prima;
- A técnica utilizada para análise dos produtos de reacção, a cromatografia em camada fina revelou ser uma técnica pouco adequada à quantificação dos compostos da reacção. Sugere-se que num estudo futuro se recorra à análise de amostras por cromatografia gasosa capilar.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A fim de otimizar o sistema e melhorar os resultados em trabalhos futuros, deixa-se algumas sugestões:

- A cromatografia em camada fina revelou ser uma técnica pouco adequada à quantificação dos compostos da reacção. Sugere-se que num estudo futuro se recorra à análise de amostras por cromatografia gasosa capilar.

- Seria interessante realizar um estudo aumentando a concentração de óleo no meio reaccional e o tempo de residência da emulsão na coluna, assim como utilizar uma coluna com maior capacidade aumentando a quantidade de enzima imobilizada e comparando os dados com os resultados obtidos com imobilização da enzima em Accurel MP 1000 ou outros suportes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczak M., Bornscheuer U. T., Bednarski W. (2009). The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel - Review Article. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **111**: 800 - 813.
- Adlercreutz, P. (1996), *Modes of using enzymes in organic media*, In: Enzymatic Reactions in Organic Media, Eds: Koskinen, A. e Klibanov, A., Ed. Blackie academic & professional, Great Britain.
- Al-Zuhair S. (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges – Review. *Biofuels, Bioprod and Bioref*, **1**:57 - 66.
- Bajaj A., Lohan P., Jha P. N., Mehrotra R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **62**, 9–14.
- Baron, A. M. (2003), *Biocatálise em ambientes aquo-restrictos: comparação de diferentes sistemas reacionais*, tese de mestrado, Universidade federal do Paraná, Curitiba.
- Bassan, N., et al. (1996). *Renewable Energy - Potencial energy crops for Europe and the Mediterranean region*. REU Technical Series 46. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome.
- Benjelloun-Mlayah B., de Lopez S., Delmas M., (1996), Oil and paper pulp from *Cynara cardunculus*: preliminary results. *Industrial crops and products*, **6**:233-236.
- Bradford, M (1976). Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**:1-2.
- Campos, L. S, (2005), *Entender a bioquímica*, Escolar Editora, 5ª edição.
- Carmona P., Correia N. (2009). Biodiesel: Tecnologia do Biodiesel. *Energias Renováveis*. Atelier Nunes e Pã. Porto, Portugal, 170-77.
- Carvalho, P. D.; Campos, P. R. B.; Noffs, M. D.; Oliveira, J. G.; Shimizu, M. T.; Silva, D. M. (2003); *Quim. Nova*, **26**:75.
- Castro A. (2003). Ciência e tecnologia: *A Química e a Reologia no Processamento dos Alimentos*; tipografia tadinense. Instituto Piaget. Portugal, 143-163.

- Cernia, E., Palocci, C. (1997), Lipases in supercritical fluids, *Methods of Enzymology*, **286** part B, 495-508.
- Chang, R. (1994), *Química*, McGraw-Hill, 5ª edição.
- Chaniotakis, N. A. A., (2004), Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. *Anal Bioanal Chem*, **378**:89-95.
- Chen, J. W.; Wu W.T. (2003), Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. *J Biosci Bioeng*, **95**:466-469.
- Chibata, I. (1978), Immobilized enzymes. *New York, John Wiley & Sons*.
- Correia, A.C., Ferreira-Dias, S., (1998), The effect of impurities of crude olive residue oil on the operational stability of the *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams, In: Stability and Stabilization of Biocatalysts (A. Ballesteros, F.J. Plou, Iborra, J.L., P. Halling, eds.), *Elsevier, Amsterdam*, 71-76.
- Costa M. A. J. (1994), *Utilização de óleos vegetais e seus derivados como combustíveis alternativos*. Relatório do trabalho de Fim de Curso de Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia.
- Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. (2004); *Quim. Nova*, **27**:623.
- De Castro, H. F.; Mendes, A. A.; Santos, J. C.; Aguiar, C. L. (2004); *Quim. Nova*, **27**:146.
- Decreto-Lei n.º 62/2006 do Ministério da Economia e da Inovação, que transpõe para a ordem jurídica nacional a Directiva n.º 2003/30/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de Maio, relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes.
- Dhanda, K. S. Experiences and Expectations from Jatropha Plantations, Proceedings of the International Conference on Biofuels, India, May 2003.
- Directiva 2009/28/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 23 de Abril de 2009, relativa à promoção da utilização de energia proveniente de fontes renováveis que altera e subsequentemente revoga as Directivas 2001/77/CE e 2003/30/CE (Texto relevante para efeitos do EEE). *Jornal Oficial da União Europeia*, L 140/16-62.
- Dizge, N.; Keskinler B. (2008), Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass Bioeng*. **32**:1274-1278.

- Dossat, V.; Combes, D.; Marty, A. (1999) Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme Microb Technol*, **25**:194-200.
- Encinar J. M., González J. F., Sabio E., Ramiro M. J. (1999). Preparation and Properties of Biodiesel from *Cynara cardunculus* L. Oil. *Ind. Eng. Chem. Res.*, **38**(8): 2927-2931.
- Erickson M. D. (1995), Interesterification, in: *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*. Ed. D. R. Erickson, AOCS Press and United Soybean Board. 277-296.
- Fernández J., Curt M. D., low-cost biodiesel from *Cynara* oil (2004); *2ª Conferencia e Exposição Mundial de Biomassa e Energia, Industria e Protecção Climateria*. Roma, Itália.
- Ferrari, R. A.; Oliveira, V. S.; Scabio, A. (2005); *Quim. Nova*, **1**:19.
- Filho A. V. L., Raulino N. M., Cesar A. C. B., Rodrigues R. J. P. (2003); O Biodiesel e a Inclusão Social; Câmara dos Deputados Conselho de Altos Estudos e Avaliação Tecnológica. Centro de Documentação e Informação Coordenação de Publicações. Brasília, Brasil.
- Geris, R.; Dos Santos, N. A. C.; Amaral, B. A.; Maia, I. S.; Castro, V. D; Carvalho, J. R. M. (2007); *Quim. Nova*, **30**(5):1369-1373.
- Gominho J, Fernández J, Pereira H., (2001), *Cynara Cardunculus* L. A new fiber crop for pulp and paper production. *Ind Crops Prod*; **13**:1-10.
- Gominho J., Pereira H. (1995). O cardo: uma matéria-prima para pasta para papel. *Actas do III congresso florestal nacional: os recursos florestais no desenvolvimento rural*, Lisboa: Sociedade Portuguesa de Ciências Florestais, **2**:427-440.
- Gupta, M. N. (1992), Enzyme function in organic solvents, *Eur. J. Biochem*, **203**:25-32.
- Hasan, F.; Shah, A. A.; Hameed, A. (2006); *Enzyme Microb. Technol.*, **39**:235.
- Illanes, A. (1994), "Biotecnologia de enzimas", *Ediciones Universitarias de Valparaíso*, Chile.
- Jaeger, K. E.; Ransak, S.; Koch, H. B.; Fernato, F.; Dijkstra, B.W. (1994), Bacterial Lipases. *FEMS Microbial. Rev.*, **15**(1):29-63.

- Johnson L. A., Myers D. J. Industrial uses for soybeans, in: *Practical Handbook of Soybean Processing and Utilization*. Ed. D. R. Erickson, AOCS Press and United Soybean Board. 1995: 410-417.
- Khmelnitsky, Y. L., Levashov, A., VKlyachko, N. L., Martinek, K. (1988) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme and Microbial Technology* **10** (12), pp. 710-724.
- Langone, M. (1998), *Síntese de triglicerídeos utilizando lipase*, Tese de Doutorado, Coordenação dos Programas de Pós-Graduação em Engenharia (COPPE) / Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Legislação Internacional. Protocolo de Quioto à convenção sobre alterações climáticas. ONU. 1997.
- Lemos, J. L. S.; Bon, E. P. S.; Santana, M. F. E.; Pereira, Jr. N. (2001), Thermalstability of xylanases produced by *Aspergillus awamory*. *Brazilian Journal of Microbiology*, **31**(3):3.
- Lima P. C. R. (2004). *O Biodiesel e a Inclusão Social*. Biblioteca Digital da Câmara dos Deputados. Centro de Documentação e Informação, Brasília, Brasil.
- Linfield, W. M., (1988), Enzymatic Fat Splitting In: *Proceedings of World Conference on Biotechnology for the Fats and Oil Industry*, (Apple White, T. H., ed.), Am. Oil Chem. Soc., Champaign, IL, USA, 131-133.
- Lourenço, M. E. V; Januário, M. I. N. (2008), Culturas energéticas e Desenvolvimento Rural, *ELA*, **2**:301-320
- Ma, F.; Hanna, M. A. (1999); *Bioresour. Technol.*, **70**:1
- Macedo, G. A., Macedo J. A. (2004). Produção de Biodiesel por Transesterificação de Óleos Vegetais, Biodiesel. *Biotechnologia Ciencia & Desenvolvimento* **32**:30 - 46, Brasil.
- Macrae, A.R., (1983), Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **60**: 291-294.
- Majer S., Mueller-Langer F., Zeller V., Kaltschmitt M. (2009). Implications of biodiesel production and utilization on global climate – a literature review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **111**:747-762.

- Malcata, F.X., Reyes, H.R., Garcia, H.S., Hill, C.G., Amundson, H. (1990). Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils – a review. *JAACS*, **67** (12): 890- 910.
- Manning, R. (2005), *Against the grain. How agriculture has hijacked civilization*, New York.
- Meher, L. C.; Sagar, D. V.; Naik S. N. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review; *Rewable and Sustainable Energy Reviews*, **10**:248 -268.
- Messing, R. A. (1975); *Imobilized enzymes for industrial reactors*, Academic Press: New York.
- Modi M. K., Reddy J.R.C., Rao B.V.S.K., Prasad R.B.N. (2007). Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology*, **98**, 1260-1264.
- Modi, M. K.; Reddy, J. R. C.; Rao, B. V. S. K.; Prasad, R. B. N. (2006); *Biotechnol. Lett.*, **28**:637.
- Nelson, J. M. e Griffin, E. G. (1916), Adsorption of invertase. *J. Am Chem. Soc*, **38** :1109-1916.
- Norma Portuguesa (2009). Combustíveis para automóveis, Ésteres metílicos de ácidos gordos (EMAG) para motores a gasóleo, Especificações e métodos de ensaio.
- Norma Portuguesa NP-14214 (2009); Combustíveis para automóveis, Ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) para motores a gasóleo, Especificações e métodos de ensaio.
- Norma Portuguesa NP-1761 (1984). Gorduras e óleos comestíveis. Determinação do teor de ácidos gordos em posição 2 nos triglicéridos (pp. 5 de 14).
- Norma Portuguesa NP-903 (1972) para Gorduras e Óleos Comestíveis.
- Oliveira, D. (1999), *Estudo comparativo da produção enzimática de ésteres a partir de óleos vegetais em solventes orgânicos e CO2 supercrítico*, Tese de Doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.
- Osório, N. M; Dubreucq, E; Da Fonseca, M. M. R; Ferreira-Dias, S. (2009), Operational stability of immobilised lipase/acyltransferase during interesterification of fat blends, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**:358-367.

- Osório, N. M; Dubreucq, E; Da Fonseca, M. M. R; Ferreira-Dias, S. (2009), Lipase/acyltransferase-catalysed interesterification of fat blends containing *n*-3 polyunsaturated fatty acids, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **111**:120-134.
- Parmentier J. (1996), Oils and fats manual – A comprehensive treatise, properties, production, applications, Ed. Karleskind A. and Wolf J-P; *Lavoisier Publishing*, Paris.; 1:1043.
- Pimentel D, (2003), Ethanol Fuels: Energy Balance, Economics, and Environmental Impacts are Negative, *Natural Resources Research*, **12**:127 – 134.
- Plieninger, T. (2007), Looking Beyond Corn and Petroleum, *Science*, **315**:1222 – 1223.
- Posorske, L.H., LeFebvre, G.K., Miller, C.A., Hansen, T.T., Glenvig, B.L., (1988), Process considerations of continuous fat modification with an immobilized lipase, *J. Am Oil Chem. Soc.*, **65**:922-926.
- Quilhó, T., Gominho, J., Pereira H. (2004). Anatomical characterisation and variability of the thistle *Cynara cardunculus* L. in view of pulping potential. *IAWA Journal*, **25**(2): 217-230.
- Ren H, Du W., Lv L., Liu D. (2011). Study on Free Lipase-Catalyzed Ethanolysis for Biodiesel Preparation in an Oil/Water Biphasic System. *J Am Oil Chem Soc.*, **88**: 1551–1555.
- Riaublanc, A., Ratamaheninaa, R., Galzy, P., Nicolas, M. (1993). Peculiar Properties of Lipase from *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron and Talice. *JAOCS*, **70**(5):497-500.
- Robles-Medina A., González-Moreno P.A., Esteban-Cerdán L., Molina-Grima E. (2009) Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, **27**:398-408.
- Sá-Pereira, P.; Carvalho, A. S. L.; Costa-Ferreira, M.; Aires-Barros, M.R. (2004), Thermostabilization of *Bacillus subtilis* CCMI 966 xylanases with trehalose. Study of deactivation kinetics. *Enzyme Microb Technol*, **34**:278-282.
- Sá-Pereira, P.; Paveia, H.; Costa-Ferreira, M.; Aires-Barros, M. R. (2003), Reviewarticle: A new look at xylanases – an overview of purification strategies. *Mol. Biotechnol.*, **24**(3):257-281.

- Schuchardt U, Sercheli R., Vargas R. M. (1998). Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *J. Braz. Chem. Soc.*, **9**, 199-210.
- Sengo, I., Gominho, J., d'Orey, L., Martins, M., d'Almeida-Duarte, E., Pereira, H., Ferreira-Dias, S. (2010), Response surface modeling and optimization of biodiesel production from *Cynara cardunculus* oil. *Eur J Lipid Sci Technol*, **112**:310 - 320.
- Shah, S.; Gupta, M. N. (2007), Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent-free system. *Process Biochem*, **42**:409-414.
- Shah, S.; Sharma, S.; Gupta, M. N. (2004), Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of Jatropha oil. *Energy Fuels*, **18**:154-159.
- Sharma, R.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. (2001); *Biotechnol. Adv.*, **19**:627.
- Shimada, Y.; Watanabe, Y.; Samukawa, T.; Sugihara, A.; Noda, H.; Fukuda, H.; Tominaga, Y. (1999), Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc.* **76**:789–793.
- Takagi, Y.; Shimada, Y. (2007), Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Mol. Catal. B. Enzym.* **44**:99-105.
- Tan, T. W.; Nie, K. L.; Wang, F. (2006); *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **128**:109
- Tecelão, C.; Guillén, M.; Valero, F.; Ferreira-Dias, S. (2012), *Biochemical Engineering Journal* **67**:104-110.
- Tecelão, C.; Silva, J.; Dubreucq, E.; Ribeiro, M. H.; Ferreira-Dias, S. (2010), Production of human milk fat substitutes enriched in omega-3 polyunsaturated fatty acids using immobilized commercial lipases and *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **65**:122-127.
- Tisher, W. e Kasche, V. (1999), Immobilized enzymes: crystals or carriers. *Trends. Biotechnol.*, **17**:326 - 335.
- Tufvesson, P.; Törnvall, U.; Carvalho, J., Karlsson, A. J.; Hatti-Kaul, R. (2011), Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **68** 200-205.
- Tyson, K. S. (2003),. Biodiesel Technology and Feedstocks. National Renewable Energy Laboratory. *Biodiesel for New England Eastern Connecticut State Univ.*

- Verdugo, C., Luque, R., Luna, D., Hidalgo, J. M., Posadillo, A., Sancho, E. D., Rodriguez, S., Ferreira-Dias, S., Bautista, F., Romero, A. A. (2010). A comprehensive study of reaction parameters in the enzymatic production of novel biofuels integrating glycerol into their composition. *Bioresource Technology*, **101**:6657 - 6662.
- Vieth, W. R. (1994), Bioprocess Engineering – Kinetic, mass transport, reactors and gene expression. *New York, John Wiley & Sons*.
- Vilmorin-Andrieux. (1885), *The vegetable garden: Illustrations, Descriptions, and culture of the garden vegetables of cold and temperate climates*, Ed. John Murray, Lda. London.
- Wang, Y., Gordon, M.H., (1991), Effect of lipid oxidation products on the transesterification activity of an immobilized lipase, *J. Agric. Food Chem.*, **39**:1693-695.
- Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A., Tominaga, Y. (2002), Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Mol Catal B Enzym.*, **17**:151-155.
- Watanabe, Y.; Shimada, Y.; Sugihara, A.; Noda, H.; Fukuda, H. (2000), Tominaga Y: Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J Am Oil Chem Soc.* **77**:355-360.
- Weil J.H. (2000). *Bioquímica Geral 2ª Edição*. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. (pp.85-247).
- Wiklund A. (1992), The genus *Cynara* L. (*Asteraceae-cardueae*). *Bot. J. Linnean Soc.*; **109**:75-123.
- Wisdom, R.A., Dunnill, P., Lilly, M.D., (1987), Enymic interesterification of fats: laboratory and pilot-scale studies with immobilized lipase from *Rhizopus arrhizus*, *Biotechnology and Bioengineering*, **29**: 1081-1085.
- Wu, W. T.; Chen, J. W. (2002), Method of preparing lower alkyl fatty acids esters and in particular biodiesel. *US Patent* **6**:398-707.
- Xu, X., Balchen, S., Hoy, C.-E., Adler-Nissen, J. (1998a). Pilot batch production of specific-structured lipids by lipase-catalized interesterification: preliminary study on incorporation and acyl migration. *JAOCs*, **75** (2): 301-308.

ANEXOS

ANEXO I

Determinação da acidez do óleo

- Fizeram-se 3 repetições:

1. $m_{\text{óleo}} = 5,175\text{g}$

$$V_{\text{NaOH gasto}} = 16,5\text{mL} - 14\text{mL} = 2,5\text{mL}$$

2. $m_{\text{óleo}} = 5,002\text{g}$

$$V_{\text{NaOH gasto}} = 18,5\text{mL} - 16,5\text{mL} = 2,0\text{mL}$$

3. $m_{\text{óleo}} = 5,118\text{g}$

$$V_{\text{NaOH gasto}} = 20,9\text{mL} - 18,5\text{mL} = 2,4\text{mL}$$

$$\bar{m}_{\text{óleo}} = \frac{5,175 + 5,002 + 5,118}{3} = 5,098$$

$$\bar{V}_{\text{NaOH gasto}} = \frac{2,5 + 2,0 + 2,4}{3} = 2,3$$

$$\text{Acidez (\%AGL)} = \frac{2,82 \times \bar{V}_{\text{NaOH gasto}}}{\bar{m}_{\text{óleo}}} \approx 1,3$$

ANEXO II

Determinação das quantidades de meio reaccional e sua constituição, no sistema descontínuo

✓ Capacidade dos Reactores:

Sabemos a capacidade de um reactor pelo seu volume, sendo que os reactores utilizados possuem uma altura de 2,7 cm e diâmetro interno 3 cm. Utilizou-se a fórmula de cálculo do volume de um cilindro; $\left[v = \frac{\pi D^2}{4} \times h \right]$. Conseguiu-se a capacidade máxima do reactor de 19 cm³, porém como não se trabalha com a totalidade do reactor afirma-se que a capacidade é de aproximadamente 17 cm³.

✓ Óleo e Solução tampão:

Para a capacidade de 17 cm³, determinou-se que 15 mL são para o óleo e solução tampão, ou seja, 5 mL de óleo e 10 mL de solução tampão.

✓ Metanol:

Sabendo que se utilizará Metanol 2 M, determinou-se o número de moles em 15mL:

2 moles ----- 1000 mL

X ----- 15 mL

X = 0,03 moles de MeOH

Sabendo que a massa molar do metanol é 32 g/mol, chegou-se ao número de gramas e com o valor de densidade de 0,7918, concluiu-se a quantidade volúmica, que tem de se colocar na solução:

32 g ----- 1 mol

Y ----- 0,03 moles de MeOH

Y = 0,96 g de MeOH

1cm³ ----- 0,7918 g

Z ----- 0,96 g MeOH

Z = 1,21mL de MeOH

✓ Enzima:

Determinou-se que a quantidade de enzima seria 10% /m/v) relativamente à quantidade de óleo. Logo, 10% de 5 mL de óleo são 0,5 g de enzima.

Determinação das quantidades de meio reaccional e sua constituição, no sistema contínuo

✓ Capacidade da coluna:

Como diferentes suportes têm característica diferente e ocupam diferentes volumes, a escolha da quantidade de suporte com enzima imobilizada foi aleatória, ou seja, enchemos a coluna de parede dupla com suporte deixando aproximadamente 1 cm da entrada da coluna. Para o suporte Lewatit utilizámos 10 g dentro da coluna e para Accurel utilizámos 3 g na coluna.

✓ Óleo:

A matéria-prima perfazia um total de 2 L e foi sendo repostada consoante a necessidade. Determinou-se testar duas percentagens diferentes de óleo, uma a 10% (m/v) e outra a 20% (m/v) o que dá aproximadamente 200 g e 400 g de óleo em solução, já que a densidade do óleo é cerca de 0,92.

✓ Metanol:

Sabendo que se utilizará Metanol 3 M, determinou-se o número de moles em 2 Litros de solução:

3 moles ----- 1000 mL

X ----- 2000 mL

X = 6 moles de MeOH

Sabendo que a massa molar do metanol é 32 g/mol, chegou-se ao número de gramas e com o valor de densidade de 0,7918, concluiu-se a quantidade volúmica, que tem de se colocar na solução:

32 g ----- 1 mol

Y ----- 6 moles de MeOH

Y = 192 g de MeOH

1 cm³ ----- 0,7918 g

Z ----- 192 g MeOH

Z = 242 mL de MeOH

✓ Solução Tampão:

A solução tampão foi adicionada à emulsão até perfazer os 2 Litros de solução.

ANEXO III

Solução-mãe – 0,0211 mg/mL

BSA (mg/mL)	BSA (microL)	Tampão (microL)	Abs595 nm
0	0	100	0
0,211	20	80	0,193
0,422	40	60	0,335
0,633	60	40	0,444
0,844	80	20	0,502
1,055	100	0	0,591

Abs = 0,6168 [BSA], massa de Lewatit VP OC 1600 = 1,476 g

1ª imobilização						
	Abs	V amostra (mL)	V total (mL)	[Proteína] (mg/mL)	Proteína total (mg)	
Solução enzima	0,595	1	50	0,965	48,23	
filtrado 1ª imobilização	0,149	5	45	0,242	10,87	
filtrado após adição glutaraldeído	0,006	5	35	0,010	0,34	
1ª lavagem	0	5	75	0,000	0,00	
2ª lavagem	0	5	110	0,000	0,00	
				Proteína imobilizada =	37,02	mg
				Proteína imobilizada/g suporte	25,08	mg/g
				rendimento da 1ª imobilização	76,76	%
2ª imobilização no filtrado da 1ª imobilização						
				massa de Lewat	1,476	g
filtrado 1ª imobilização	0,149	5	45	0,242	10,87	
filtrado 2ª imobilização	0,133	5	32	0,216	6,90	
filtrado após adição glutaraldeído	0					
1ª lavagem	0					
2ª lavagem	0			Proteína imobilizada 2ª imob=	3,97	mg
				Proteína imobilizada/g suporte=	2,69	mg/g
				rendimento da 2ª imobilização=	36,52	%
3ª imobilização no filtrado da 2ª imobilização						
				massa de Lewat	1,476	g
filtrado 2ª imobilização	0,133	5	32	0,216	6,90	
filtrado 3ª imobilização	0,084	5	25	0,136	3,40	
filtrado após adição glutaraldeído	0					
1ª lavagem	0					
2ª lavagem	0			Proteína imobilizada 3ª imob=	3,50	mg
				Proteína imobilizada/g suporte=	2,37	mg/g
				rendimento da 3ª imobilização=	50,66	%

Total de suporte=	4,428	g	
Proteína total imobilizada=	44,49	mg	
Proteína total imobilizada/g suporte=	10,05	mg/g de suporte	
Rendimento global da imobilização=	92,24	%	

ANEXO IV

Produção de biodiesel em sistema descontínuo, com 10% de óleo e enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600, [AGL] = 1,3%

	DAG			AGL			TAG			EMAG			
Tempo	Área	%Área	% massa	Área	%Área	% massa	Área	%Área	% massa	Área	%Área	% massa	Σ Áreas
0	606,33	11,70	0,5	1277,94	24,65	1,30	3299,33	63,65	98,20	0,00	0,00	0,00	5183,6
3	733,32	27,04	0,6	628,03	23,16	1,22	1350,43	49,80	76,83	0,00	0,00	21,34	2711,78
6	952,25	25,20	0,8	569,09	15,06	0,79	1179,5	31,21	48,15	1078,47	28,54	50,27	3779,31
9	637,57	16,70	0,5	1023,59	26,81	1,41	914,94	23,97	36,98	1241,54	32,52	61,08	3817,64
24	425,8	20,07	0,4	986,93	46,52	2,45	0,0000	0,00	0,00	709,01	33,42	97,20	2121,74
30	481,87	27,67	0,4	677,1	38,89	2,05	0,0000	0,00	0,00	582,22	33,44	97,55	1741,19
48	426,69	22,82	0,4	797,32	42,64	2,25	0,0000	0,00	0,00	645,77	34,54	97,40	1869,78

Produção de biodiesel em sistema descontínuo, com 10% de óleo e enzima imobilizada em Accurel MP 1000, [AGL] = 1,3%

	DAG			AGL			TAG			EMAG			
Tempo	Área	%Área	% massa	Área	%Área	% massa	Área	%Área	% massa	Área	%Área	% massa	Σ Áreas
0	450,67	13,79	0,50	658,85	20,15	1,30	2159,57	66,06	98,20	0,00	0,00	0,00	3269,09
3	320,85	14,44	0,36	493,41	22,21	1,43	1407,67	63,35	94,18	0,00	0,00	4,04	2221,93
6	523,01	16,20	0,58	620,39	19,22	1,24	1536,07	47,59	70,74	548,3200	16,99	27,44	3227,79
24	596,07	25,87	0,66	403,8	17,52	1,13	688,86	29,90	44,44	615,4800	26,71	53,77	2304,21
48	516,26	20,52	0,57	547,45	21,76	1,40	625,04	24,84	36,93	827,33	32,88	61,10	2516,08

ANEXO V

Produção de biodiesel em sistema contínuo, enzima imobilizada em Lewatit VP OC 1600

Ensaio 1: com 10% de óleo

	DAG			AGL			TAG			EMAG			
Tempo	área	% área	% massa	área	% área	% massa	área	% área	% massa	área	% área	% massa	Σ Áreas
0	1406,11	30,62	0,50	1098,89	23,93	1,30	2087,82	45,46	98,20	0,00	0,00	0,00	4592,82
43	1291,26	27,35	0,46	1163,02	24,63	1,34	1993,01	42,21	91,18	274,71	5,82	7,03	4722
48	1079,41	28,27	0,38	841	22,03	1,20	1682,27	44,06	95,18	215,23	5,64	3,23	3817,91
116	1531,12	26,47	0,54	1209,09	20,90	1,14	2517,17	43,52	94,01	527	9,11	4,31	5784,38
118	1419,36	27,82	0,50	1102,69	21,62	1,17	2256,08	44,23	95,54	322,94	6,33	2,78	5101,07
141	1228,03	26,56	0,44	953,29	20,62	1,12	2138,12	46,24	99,89	304,3	6,58	0,00	4623,74

Ensaio 2: com 20% de óleo

	DAG			AGL			TAG			EMAG			
Tempo	Área	%Área	% massa	Área	%Área	%massa	Área	%Área	%massa	Área	%Área	%massa	Σ Áreas
0	501,08	21,07	0,50	271,27	11,41	1,30	1605,84	67,52	98,20	0,00	0,00	0,00	2378,19
21	588,83	20,14	0,59	320,12	10,95	1,25	1777,25	60,78	88,40	237,7700	8,13	9,77	2923,97
24	658,28	20,73	0,66	349,98	11,02	1,26	1925,65	60,65	88,21	240,96	7,59	9,88	3174,87
45	548,03	18,26	0,55	304,09	10,13	1,15	1898,44	63,25	91,99	250,83	8,36	6,31	3001,39
48	679,96	20,54	0,68	360,3	10,88	1,24	2015,7	60,88	88,54	255,05	7,70	9,55	3311,01
70	800,93	18,92	0,80	452,99	10,70	1,22	2657,39	62,77	91,29	322,27	7,61	6,70	4233,58

ANEXO VI

Produção de biodiesel em sistema contínuo, com 20% de óleo e enzima imobilizada em Accurel

	DAG			AGL			TAG			EMAG			
Tempo	Área	%Área	% massa	Área	%Área	%massa	Área	%Área	%massa	Área	%Área	%massa	Σ Áreas
0	358,63	12,23	0,50	586,04	19,99	1,30	1987,2	67,78	98,20	0,00	0,00	0,00	2931,87
7	310,99	9,70	0,43	775,00	24,16	1,57	2121,18	66,14	95,82	0,00	0,00	2,17	3207,17
21	413,32	12,12	0,58	473,09	13,88	0,90	2093,64	61,41	88,97	429,32	12,59	9,55	3409,37
24	276,60	7,14	0,39	862,35	22,25	1,45	2247,48	57,99	84,02	488,87	12,62	14,14	3875,30
28	447,82	11,40	0,62	688,54	17,52	1,14	2300,23	58,54	84,82	492,61	12,54	13,42	3929,20
31	425,93	10,78	0,59	629,42	15,93	1,04	2408,70	60,95	88,30	488,17	12,35	10,07	3952,22
48	472,35	13,12	0,66	555,07	15,41	1,00	2098,19	58,26	84,40	475,97	13,22	13,93	3601,58
53	471,91	13,17	0,66	643,65	17,97	1,17	1992,06	55,61	80,57	474,56	13,25	17,60	3582,18
71	352,76	10,62	0,49	461,73	13,90	0,90	2032,47	61,20	88,67	473,90	14,27	9,93	3320,86
76	364,66	10,83	0,51	504,13	14,97	0,97	2024,2	60,10	87,07	475,15	14,11	11,45	3368,14
94	593,30	16,07	0,83	615,24	16,67	1,08	2014,46	54,57	79,06	468,59	12,69	19,03	3691,59
173	539,16	14,27	0,75	747,38	19,78	1,29	2053,69	54,35	78,75	438,16	11,60	19,21	3778,39
197	688,07	18,45	0,96	635,44	17,04	1,11	1992,18	53,42	77,39	413,69	11,09	20,54	3729,38
239	419,62	12,03	0,59	810,28	23,24	1,51	1953,8	56,03	81,18	303,38	8,70	16,73	3487,08
242	550,95	15,05	0,77	789,61	21,56	1,40	2101,39	57,38	83,14	220,02	6,01	14,69	3661,97
290	612,82	16,69	0,85	812,33	22,13	1,44	1941,05	52,87	76,61	304,82	8,30	21,10	3671,02
314	620,08	17,39	0,86	750,35	21,04	1,37	1894,66	53,14	76,98	300,58	8,43	20,78	3565,67
338	548,48	15,74	0,76	677,61	19,45	1,26	1973,22	56,64	82,06	284,66	8,17	15,91	3483,97
362	588,18	19,59	0,82	608,92	20,28	1,32	1806,03	60,14	87,13	0,00	0,00	0,00	3003,13